



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

**Identifizierung und Quantifizierung der Ketocarotinoide in Dauerstadien  
von Grünalgen und Ketocarotinoidbiosynthese im Modellorganismus  
*Chlamydomonas reinhardtii***

Dissertation zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Matthias Emanuel Bauch  
geb. in Hadamar  
Mainz, 2011



Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der Mündlichen Prüfung: 29.11.2011



Damit du, losgebunden, frei,  
Erfahrest, was das Leben sei.

Johann Wolfgang von Goethe



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Carotinoide</b>	<b>12</b>
1.1.1. Vorkommen	12
1.1.2. Funktion der Carotinoide	13
1.1.3. Bioengineering zur Carotinoidherstellung	14
<b>1.2. Biosynthese der Carotinoide</b>	<b>15</b>
<b>1.3. Grünalgen</b>	<b>16</b>
1.3.1. Ketocarotinoidakkumulation in Grünalgen	17
1.3.2. Ketocarotinoidbiosynthese in <i>H. pluvialis</i> und <i>M. zoofingensis</i>	18
1.3.3. Ketocarotinoidbiosynthese in <i>C. reinhardtii</i>	18
<b>1.4. Ziele der Promotionsarbeit</b>	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Geräte</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Chemikalien</b>	<b>22</b>
2.2.1. Chemikalien und Bezugsquellen	22
2.2.2. Primer	22
2.2.3. Polymerasen	22
2.2.4. Plasmide	23
2.2.5. Antibiotika	24
2.2.6. Restriktionsenzyme	24
2.2.7. Referenzpigmente	24
<b>2.3. Mikrobiologische Methoden</b>	<b>24</b>
2.3.1. Steriles Arbeiten	24
2.3.2. Mikroorganismen	25
2.3.3. Kultivierung von Mikroalgen	26
2.3.4. Kultivierung von Bakterien	26
2.3.5. Bestimmung der Zelldichte	27
2.3.6. Lichtmikroskopische Untersuchungen	27
2.3.7. Zellzählung	27
2.3.8. Herstellung von kompetenten Zellen	27
2.3.9. Transformation	28
2.3.10. Dauerkulturen	28
2.3.11. Vernichtung von Bakterienkulturen	28
2.3.12. Überexpression	28

<b>2.4.</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>29</b>
2.4.1.	Isolierung von Pigmenten aus Bakterienproben	29
2.4.2.	Isolierung von Pigmenten aus Mikroalgen	29
2.4.3.	Fraktionierung von Pigmentextrakten aus Mikroalgen	30
2.4.4.	Verseifung von Pigmentfraktionen aus Mikroalgen	32
2.4.5.	Selektive Reduktion von Pigmentextrakten mit NaBH <sub>4</sub> .	32
2.4.6.	Thermische Isomerisierung von 4-Ketolutein	33
<b>2.5.</b>	<b>Pigmentanalytik</b>	<b>34</b>
2.5.1.	Photometrische Pigmentuntersuchung	34
2.5.2.	Anlagenspezifikation HPLC	34
2.5.3.	Probenvorbereitung HPLC	34
2.5.4.	HPLC-Methoden	35
2.5.5.	Pigmentidentifizierung/ Eichung der HPLC-Anlage	37
<b>2.6.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>38</b>
2.6.1.	PCR-Methoden	38
2.6.2.	Aufreinigungen von DNA-Proben	41
2.6.3.	RNA-Isolierung	41
2.6.4.	Reverse Transkription	41
2.6.5.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
2.6.6.	A-Addition	42
2.6.7.	Klonierung	42
2.6.8.	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.6.9.	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	43
2.6.10.	Plasmidpräparation	43
2.6.11.	Sequenzierung und Sequenzanalyse	43
<b>2.7.</b>	<b>Datenbanken und Bioinformatikprogramme</b>	<b>44</b>
<b>3.</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>45</b>
<b>3.1.</b>	<b>Identifizierung und Quantifizierung von Ketocarotinoiden und die Verbreitung der Fähigkeit zur Akkumulation von 4-Ketolutein in Dauerstadien der Grünalgen</b>	<b>45</b>
3.1.1.	Analyse der Pigmentzusammensetzung von Grünalgenvertretern in der exponentiellen Wachstumsphase.	45
3.1.2.	Analyse der Pigmentzusammensetzung von Dauerstadien ausgewählter Grünalgenvertreter	46
3.1.2.1.	Bildung der Dauerstadien	47
3.1.2.2.	Die HPLC-Analyse der Pigmentzusammensetzung in der Übersicht	48
3.1.3.	Identifizierung der freien Pigmente aus Grünalgen-Dauerstadien	53
3.1.3.1.	Identifikation freier Ketocarotinoide	53
3.1.3.2.	Identifizierung von 4-Ketolutein in Dauerstadien von Grünalgen. Die Präparation von 4-Ketolutein	53 54
	Die chemische Reduktion von 4-Ketolutein mit NaBH <sub>4</sub>	56
3.1.3.3.	Erstellung einer Spektrenbibliothek von cis-Isomeren des Astaxanthins	57
3.1.3.4.	Erstellung einer Spektrenbibliothek von cis-Isomeren des 4-Ketoluteins	58



3.1.4.	Untersuchung der Gesamtzusammensetzung der Pigmente in algalen Dauerstadien	62
3.1.4.1.	Analyse der Pigmentstöchiometrien ausgewählter Grünalgen durch Untersuchung verseifeter Pigmentextrakte und deren selektiver Reduktion mit NaBH <sub>4</sub>	62
3.1.4.2.	Analyse der Pigmentzusammensetzung in reifen Aplanosporen von <i>H. pluvialis</i>	64
3.1.4.3.	Analyse der Pigmentzusammensetzung in den Ketocarotinoid-Mono- und – Diacylestern aus reifen Aplanosporen von <i>H. pluvialis</i>	65
3.1.4.4.	Analyse der Pigmentzusammensetzung in reifen Zygoten von <i>C. reinhardtii</i>	67
3.1.4.5.	Analyse der Pigmentzusammensetzung in den Ketocarotinoid-Mono- und – Diacylestern aus reifen Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i>	69
3.1.4.6.	Analyse der Pigmentzusammensetzung in reifen Aplanosporen von <i>F. tuberosa</i>	70
3.1.4.7.	Analyse der Pigmentzusammensetzung in den Ketocarotinoid-Mono- und – Diacylestern aus reifen Aplanosporen von <i>F. tuberosa</i>	71
3.1.4.8.	Analyse der Pigmentzusammensetzung in reifen Aplanosporen von <i>M. zofingiensis</i>	73
3.1.4.9.	Analyse der Pigmentzusammensetzung in den Ketocarotinoid-Mono- und – Diacylestern aus reifen Aplanosporen von <i>M. zofingiensis</i>	74
3.1.4.10.	Analyse der Pigmentzusammensetzung in reifen Aplanosporen von <i>S. rubescens</i>	75
3.1.4.11.	Analyse der Pigmentzusammensetzung in den Ketocarotinoid-Mono- und – Diacylestern aus reifen Aplanosporen von <i>S. rubescens</i>	77
3.1.5.	Vergleich der Carotinoidzusammensetzung in Dauerstadien verschiedener Grünalgenverteter	78
3.1.6.	Vergleich der Pigmentzusammensetzung in den Mono- und Diacylestern aus Dauerstadien unterschiedlicher Grünalgen	81
<b>3.2.</b>	<b>Regulation der Ketocarotinoidbiosynthese in Zygosporen von <i>C. reinhardtii</i></b>	<b>83</b>
<b>3.3.</b>	<b>Charakterisierung von Schlüsselenzymen der Carotinoidbiosynthese in <i>C. reinhardtii</i></b>	<b>85</b>
3.3.1.	Erweiterung des Substratportfolios durch die Herstellung neuer carotinoid-produzierender Bakterienstämme als Voraussetzung für die Charakterisierung der Enzyme aus <i>C. reinhardtii</i>	85
3.3.1.1.	Herstellung eines $\beta$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes	86
	Herstellung eines Lycopin produzierenden Bakterienstammes	87
3.3.1.2.	Herstellung eines Canthaxanthin produzierenden Bakterienstammes	88
3.3.1.3.	Herstellung eines $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes	89
	Zwischenschritt der Herstellung von Rubixanthin und $\gamma$ -Carotin produzierenden Bakterienstämmen	90
	Eignungstest einer Kombination der Lycopinzyklasen aus <i>C. reinhardtii</i> zur Synthese von $\alpha$ -Carotin	92
	Eignungstest eines Lycopinzyklase-Fusionsproteins aus der Grünalge <i>Ostreococcus lucimarinus</i>	94
3.3.1.4.	Herstellung eines Lutein produzierenden Bakterienstammes	98
	Eignungstest der Hydroxylase CrtZ aus dem Bakterium <i>Erwinia uredovora</i>	98
	Der Einfluss der Vektorpräsequenz auf die Substratspezifität der crtZ	101
	Klonierungsstrategie und Test des Konstrukts pLUTEIN	102
3.3.2.	Funktionelle Charakterisierung des Schlüsselenzyms in der Biosynthese der Ketocarotinoide, der $\beta$ -Carotin-Ketolase (BKT) aus <i>C. reinhardtii</i>	104
3.3.2.1.	Funktionsnachweis der BKT in $\beta$ -Carotin produzierenden Top10-Zellen	104
3.3.2.2.	Funktionsnachweis der BKT in Zeaxanthin produzierenden Top10-Zellen	107

3.3.2.3.	Die Aktivität der CrBKT-pBAD in $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin produzierenden Top10-Zellen im Vergleich	110
3.3.2.4.	Funktionstest der BKT in $\alpha$ -Carotin produzierenden Top10-Zellen	112
3.3.2.5.	Funktionstest der CrBKT-pBAD in Lutein produzierenden Top10-Zellen	114
3.3.3.	Funktionelle Charakterisierung der Carotinoid-Hydroxylasen aus <i>C. reinhardtii</i>	116
3.3.3.1.	Die Carotinoidhydroxylase- $\beta$ (CHYB)	116
	Funktionstest der CHYB in $\beta$ -Carotin produzierenden XL1-BLUE-Zellen	116
	Funktionstest der CHYB in Canthaxanthin produzierenden XL1-BLUE-Zellen	118
	Funktionstest der CHYB in $\alpha$ -Carotin produzierenden Top10-Zellen	120
3.3.3.2.	Die Cytochrom P450-Carotinoid-Hydroxylase CYP97A5 aus <i>C. reinhardtii</i>	122
3.3.3.3.	Die Cytochrom P450-Carotinoid-Hydroxylase CYP97C3 aus <i>C. reinhardtii</i>	124
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>127</b>
<b>4.1.</b>	<b>Die Biosynthese von Ketocarotinoiden in Grünalgen</b>	<b>127</b>
4.1.1.	Verbreitung der Fähigkeit zur Synthese des bisher nur aus nur einer Grünalge beschriebenen Ketocarotinoids 4-Ketolutein innerhalb der Gruppe der Grünalgen	127
4.1.2.	Welche Faktoren kontrollieren das Mengenverhältnis der Ketocarotinoide 4-Ketolutein und Astaxanthin in Grünalgen?	129
4.1.2.1.	Regulation des Biosyntheseweges durch die Lycopinzyklasen	129
4.1.2.2.	Neusynthese vs. Recycling von Carotinoiden als Substrate für die Ketocarotinoidbiosynthese	130
4.1.2.3.	Die Spezifität der Ketolasen und der Hydroxylasen	132
4.1.3.	Auffälligkeiten in der Zusammensetzung der freien Pigmente, Monoester und Diester	136
4.1.3.1.	4-Ketolutein tritt nur als freies Pigment oder als Monoacyl ester auf	136
4.1.3.2.	<i>F. tuberosa</i> akkumuliert große Mengen an Echinenon	136
4.1.4.	Die Identität der Fettsäuren in den Ketocarotinoidacylestern	137
<b>4.2.</b>	<b>Erweiterung des Portfolios an carotinogenen <i>E. coli</i>-Stämmen als Voraussetzung für Screenings und Charakterisierung von Carotinoidbiosyntheseenzymen</b>	<b>138</b>
4.2.1.	Herstellung neuer <i>E. coli</i> -Bakterienstämme mit der Fähigkeit zur Produktion von Canthaxanthin, $\gamma$ -Carotin und Rubixanthin	138
4.2.2.	Charakterisierung eines Zyklasefusionsproteins aus der ursprünglichen Grünalge <i>Ostreococcus lucimarinus</i>	139
4.2.3.	Entwicklung eines $\alpha$ -Carotin produzierenden <i>E. coli</i> -Stammes	139
4.2.4.	Entwicklung eines Lutein produzierenden <i>E. coli</i> -Stammes	140
<b>4.3.</b>	<b>Der Biosyntheseweg der Ketocarotinoide in der Grünalge <i>C. reinhardtii</i></b>	<b>142</b>
4.3.1.	Funktion der $\beta$ -Carotin-Ketolase (BKT) aus <i>C. reinhardtii</i>	142
4.3.2.	Carotinoid-Hydroxylierung in <i>C. reinhardtii</i>	144
4.3.2.1.	Die Häm-freie $\beta$ -Carotin-Hydroxylase (CHYB)	144
4.3.2.2.	Die Cytochrom P450 Carotinoidhydroxylasen (CYP97A5, CYP97C3)	145
4.3.3.	Der Weg der Biosynthese von Ketocarotinoiden in <i>C. reinhardtii</i>	147
4.3.4.	Regulation der Zygosporenspezifität der Ketocarotinoidbiosynthese in <i>C. reinhardtii</i>	149

---

<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>151</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>153</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>163</b>
A.1.	Verwendete Geräte	163
A.2.	Sequenzen der Vektoren mit den zu charakterisierenden Genen	165
A.3.	Sequenzen der Plasmide zur Carotinoidproduktion in <i>E. coli</i>	169
A.4.	Primersequenzen	196
A.5.	Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten	199
A.6.	Vergleich der Pigmentanteile aus den Verseifungs- und Reduktionsexperimenten zur Analyse der Pigmentzusammensetzung in Dauerstadien der Grünalgen	200
A.7.	Pigmentquantifizierung der Isomerisierungsprodukte von all-trans-4-Ketolutein	201
A.8.	Chromatogramme zu den Charakterisierungsexperimenten der BKT	202
A.9.	Pigmentspektren	205

## 1. Einleitung

### 1.1. Carotinoide

Heinrich Wackenröder isolierte die ersten Carotinoide aus Karotten (Wackenroder, 1831). Daher leitet sich auch der Name „Carotinoide“ ab. Derzeit liegt die Zahl der bekannten natürlich vorkommenden Carotinoide bei etwa 750 (Britton et al., 2004). Die hohe Zahl an konjugierten Doppelbindungen im Molekül ist dafür verantwortlich, dass Carotinoide eine starke Hauptabsorption im Bereich des sichtbaren Lichts zeigen, was ihre gelbe, orange oder rote Farbgebung verursacht. Sie gliedern sich in zwei Gruppen: Carotine, die nur aus Kohlenstoff- und Wasserstoff-Atomen aufgebaut sind, und Xanthophylle, die Sauerstofffunktionen tragen (Britton, 1998). Zu den Xanthophyllen gehören auch die Ketocarotinoide. In der Literatur wird zwischen primären und sekundären Carotinoiden unterschieden. Primärcarotinoide sind an der Photosynthese beteiligt, Sekundärcarotinoide haben verschiedenste weitere Funktionen (Goodwin, 1980; Howitt und Pogson, 2006). Auf Grund des langen Polyensystems existieren von den Carotinoiden geometrische Isomere (*cis-trans*-Isomere), wobei die energetisch begünstigten *all-trans*-Isomere normalerweise die Hauptkomponente in der Natur darstellen (Britton et al., 2004). Viele Carotinoide tragen ein oder mehrere Chiralitätszentren, weshalb es auch optische Isomere (*R/S*-Isomere) gibt. Außerdem treten Xanthophylle in der Natur oft in glykosylierter Form, als Glycosylester oder mit Fettsäuren verestert auf.

Insgesamt sind die Pigmente mit den langen Kohlenwasserstoffketten unpolare Moleküle, weshalb sie hauptsächlich in hydrophoben Bereichen der Zelle vorkommen. Durch die Assoziation mit Proteinen können sie sich auch in wässrigen Kompartimenten aufhalten (Britton, 1998).

#### 1.1.1. Vorkommen

Carotinoide werden vor allem in Pflanzen und Algen gebildet. Dort finden sie sich vorwiegend in photosynthetisch aktiven Geweben, in denen ihre Farbe allerdings nicht direkt sichtbar ist, da sie von den grünen Chlorophyllen maskiert wird. Carotinoide sind aber auch für die Farbgebung vieler gelber, oranger und roter Gewebe in Pflanzen verantwortlich, wie z. B. der Wurzeln der Karotte, den Blüten der Ringelblume und den Früchten von Tomate, Paprika und Hagebutten (Goodwin, 1980; Howitt und Pogson, 2006). Grünalgen wie *Haematococcus pluvialis* oder *Muriella zofingiensis* lagern bei ungünstigen

Umweltbedingungen Ketocarotinoide ein, wodurch sie rot, bzw. orange erscheinen (Lemoine und Schoefs, 2010). Carotinoide wurden aber auch in Tieren, Pilzen und Bakterien nachgewiesen (Goodwin, 1984). Zum Beispiel kann der Hefepilz *Xanthophyllomyces dendrorhous* Astaxanthin produzieren (Ukibe et al., 2008).

Obwohl Tiere keine Carotinoide *de novo* synthetisieren können, weisen sie zum Teil hohe Konzentrationen dieser Pigmente im Gewebe auf. Carotinoide finden sich zum Beispiel im Gefieder von Flamingos, im Muskelfleisch von Lachs und Forelle, im Eidotter und in der Schale von Crustaceen wie Hummer oder Shrimps. Tiere müssen die Pigmente über ihre Nahrung aufnehmen. Im tierischen Stoffwechsel können die Moleküle dann unter Umständen noch modifiziert werden (Britton et al., 2004). In Kombination mit Proteinen kann sich die Farbausprägung verändern, z. B. kommt das Rot des Astaxanthins im Hummer erst beim Kochen zum Vorschein, wenn es aus dem hitzedenaturierten Crustacyanin-Protein herausgelöst wird (Britton, 1998).

### 1.1.2. Funktion der Carotinoide

Carotinoide sind universell in den Photosynthesystemen von Pflanzen, Algen und Cyanobakterien vertreten. Dort besitzen sie verschiedene Aufgaben. Einerseits fungieren sie als Antennenpigmente zum Einfangen von Licht in den Light-Harvesting-Complexen und erweitern damit die Bandbreite des absorbierten Lichts (Cunningham und Gantt, 1998). Andererseits schützen sie vor zu hohen Lichtintensitäten durch nicht-photochemisches Quenching (NPQ). Bei hohen Lichtintensitäten sind sehr viele Chlorophyllmoleküle im angeregten Zustand. Ist die Elektronentransportkette ausgelastet, können sie ihre Energie nicht mehr abgeben, wodurch die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Triplett-Chlorophyllen steigt. Durch Triplett-Chlorophyll können Singulett-Sauerstoff und weitere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die den Photosyntheseapparat und die Zelle stark schädigen können. Carotinoide, die mit den Reaktionszentren und Antennenpigmenten assoziiert sind, fangen effizient Triplett-Chlorophyll, Singulett-Sauerstoff so wie Superoxid-Anionen ab. Außerdem können Carotinoide überschüssige Lichtenergie, die durch die Antennenpigmente aufgenommen wird, dissipieren (Niyogi, 1999; Müller et al., 2001; Ledford und Niyogi, 2005). Sekundäracarotinoide dagegen dienen beispielsweise der Farbgebung von Blüten und Früchten, wodurch sie Bestäuber und Samenverbreiter anlocken sollen (Howitt und Pogson, 2006).

Auch für den Menschen sind die Farben der Lebensmittel attraktiv. Daher spielen Farbstoffe in der Lebensmittelindustrie eine wichtige Rolle. Unter den zugelassenen Lebensmittelzusatzstoffen der EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit) finden sich einige Carotinoide, zum Beispiel E160a (Carotine, gemischte Carotine,

$\beta$ -Carotin), E160b (Annatto; Bixin; Norbixin), E160c (Paprika-Extrakt; Capsanthin; Capsorubin), E160d (Lycopin), E161b (Lutein) und E161g (Canthaxanthin).

Besonders der Einsatz als Futterbestandteile in der industriellen Geflügel- und Fischzucht ist ein großer Absatzmarkt für Carotinoide. Sie verleihen dem Eidotter von Eiern ihre gelb-orange Farbe oder kolorieren das Fleisch von Geflügel (Farré et al., 2010). In der Fischzucht werden Ketocarotinoide wie Astaxanthin eingesetzt, wo sie z.B. dem Fleisch von Zuchtlachsen und Forellen seine rötliche Färbung verleihen. Auch ihre antioxidative Wirkung macht Ketocarotinoide für den Menschen interessant als Nahrungsergänzung und Arzneimittelbestandteil (Higuera-Ciapara et al., 2006).

### 1.1.3. Bioengineering zur Carotinoidherstellung

Der Marktanteil der Carotinoide stieg in den vergangenen Jahren kontinuierlich an. Auch für die Zukunft werden von verschiedenen Agenturen steigende Nachfragen prognostiziert. Zurzeit ist der Marktanteil der synthetisch hergestellten Carotinoide größer als der biotechnologisch produzierte Anteil. Das liegt vor allem an den geringeren Kosten der synthetischen Produktion. Ein Vorteil der biotechnologischen produzierten Xanthophylle ist, dass die Carotinoide nicht aus einem Enantiomeregemisch bestehen. Um einen höheren Marktanteil zu erzielen, müssen die Produkte aber kostengünstiger werden. Dafür gibt es mehrere Ansatzpunkte, wie z.B. eine günstigere biotechnologische Produktion, die Etablierung neuer Organismen mit der Fähigkeit zu einer hohen Carotinoidproduktion, sowie metabolisches Engineering, um den Carotinoidgehalt zu steigern oder in Organismen, die für die Produktion von Carotinoiden etabliert sind, eine veränderte Carotinoidkomposition produzieren zu lassen (Das et al., 2007; Misawa, 2009; Farré et al., 2010).

Viele Fragen in der Biosynthese von Carotinoiden sind noch ungeklärt. In der Forschung besteht ein Bedarf an neuen speziellen Carotinoiden als Referenzpigmenten und Substraten, die kommerziell nicht erhältlich sind. Eine chemische Synthese ist oft schwierig, und besonders asymmetrische Carotinoide sind aufwendiger zu synthetisieren. Misawa et al. (1990) präsentierten der Forschungsgemeinde 1990 Plasmide mit Genen von *E. uredoovora*, die *E. coli* befähigen Carotinoide zu produzieren. Diese haben in der Carotinoidbiosyntheseforschung einen festen Platz eingenommen und werden seit dieser Zeit für Screenings und Charakterisierungen von neuen Carotinoidbiosyntheseenzymen genutzt. Auch für Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit bildeten Bakterien mit der Fähigkeit zur Produktion von verschiedenen Carotinoiden die Grundlage.

## 1.2. Biosynthese der Carotinoide

Das C<sub>40</sub>-Gerüst der Carotinoide ist aus 8 Isopreneinheiten aufgebaut. Die Biosynthese geht vom Isopentenylidiphosphat (IPP) aus.

Die C<sub>5</sub>-Einheiten können zum einen im Cytoplasma über den Mevalonatweg (MVA) synthetisiert werden. Hier verläuft der Syntheseweg von Acetyl-CoA über Mevalonat-5-diphosphat zu IPP (Lichtenthaler, 1999; Schopfer und Brennicke, 2005). Das cytosolisch hergestellte IPP dient allerdings nicht zur Bildung von Carotinoiden, sondern in erster Linie der Synthese von Sterolen (Lichtenthaler, 1999). In den Plastiden von höheren Pflanzen und Algen ist ein prokaryotischer Stoffwechselweg, der Methylerythritol-4-phosphatweg (MEP) zur Synthese von IPP erhalten. Höhere Pflanzen besitzen sowohl den MVA- als auch den MEP-Weg zur Isoprenoidsynthese. In Algen hingegen scheint der MVA-Weg in der Evolution mehrmals verloren gegangen zu sein (Lohr et al., 2011). In Grünalgen existiert zum Beispiel ausschließlich der MEP-Weg. Damit müssen die Isoprenoidvorläufermoleküle für Sterole aus dem Chloroplast ins Cytoplasma exportiert werden (Schwender et al., 2001; Grossman et al. 2004; Lohr et al., 2011).

Die Synthese von IPP in den Plastiden von Pflanzen und Algen verläuft ausgehend von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat über Methylerythritol-4-phosphat zu IPP (Schopfer und Brennicke, 2005). Aus IPP und seinem Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) können viele verschiedene Isoprenoidkomponenten gebildet werden. Durch Kopf-Schwanz-Addition von einem DMAPP- und drei IPP-Molekülen wird das C<sub>20</sub>-Molekül Geranylgeranylpyrophosphat gebildet (GGPP). Die Phytoensynthase verbindet anschließend zwei C<sub>20</sub>-Moleküle zu einem C<sub>40</sub>-Molekül, dem Phytoen (Cunningham und Gantt, 1998). Aus Phytoen wird durch zwei von der Phytoendesaturase katalysierte Dehydrierungsschritte ζ-Carotin, das erste farbige Molekül mit einer blassgelben Farbe. Durch die ζ-Carotindesaturase wird in zwei weiteren Dehydrierungsschritten das π-Elektronensystem weiter verlängert, wodurch das rote Lycopin entsteht. Die β-Zyklase und die ε-Zyklase katalysieren anschließend den Ringschluss zu α-Carotin und β-Carotin (Cunningham und Gantt, 1998).

### 1.3. Grünalgen

Grünalgen (Chlorophyta) sind enge Verwandte der Landpflanzen, mit denen sie im Stamm der grünen Pflanzen (Viridiplantae) zusammengefasst werden (Becker und Marin, 2009). Eine der bestuntersuchten Grünalgen ist der Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii*, eine bodenlebende monadoide Alge. *C. reinhardtii* besitzt einen becherförmigen Chloroplasten, der ein oder mehrere Pyrenoide umschließt (Harris, 2001). Im Lichtmikroskop kann der orange gefärbte Augenfleck beobachtet werden, der seine Farbgebung Carotinoiden verdankt. Zwei gleichlange Geißeln ermöglichen den Zellen Beweglichkeit und Phototaxis. Aufgrund seiner guten Kultivierbarkeit mit Verdopplungsraten von 6-8 Stunden und der Fähigkeit zu heterotrophem Wachstum unter der Verstoffwechslung von Acetat als Energiequelle ist *C. reinhardtii* seit Jahrzehnten eines der wichtigsten Modelle der Photosyntheseforschung (Harris, 2001). Erst kürzlich hat die Untersuchung des zur Fortbewegung von *C. reinhardtii* dienenden Geißelapparates auch für die Humanbiologie zunehmende Bedeutung erlangt für das Verständnis von Krankheiten, die auf Ciliendefekten beruhen. Die Wichtigkeit dieses Modellorganismus spiegelt sich schließlich auch darin wider, dass *C. reinhardtii* die erste Alge war, deren Genom sequenziert wurde (Grossman et al., 2003; Merchant et al., 2007).

Bei guter Nährstoffversorgung vermehrt sich *C. reinhardtii* durch asexuelle mitotische Teilungen. Unter ungünstigen Umweltbedingungen differenzieren sich die Zellen zum mt+ (mating type plus) und mt- Gameten. Die Differenzierung kann im Labor durch Stickstoffmangel im Nährmedium simuliert werden. Die Gameten bilden plus- und minus-Agglutinine aus, die entlang der Geißelschäfte exponiert werden. Bei der Vereinigung der Gameten erfolgt die Kontaktaufnahme über die Agglutinine auf den Geißeln. Anschließend erfolgt der Abwurf der Zellwand durch Gametolysin. Durch die Fusion bildet sich eine Zygote mit vier Geißeln. Die Weitergabe der Plastiden erfolgt über den plus-Elter, während die Mitochondrien über den minus-Elter weitergegeben werden. Bei anhaltend schlechten Umweltbedingungen bildet die diploide Zygote eine derbe Zellwand und entwickelt sich zur Ruhezygote (Hypnozygote). Die auffälligsten Veränderungen, die sich bei der Reifung der Zygoten ergeben, sind der Rückbau der Plastiden, die massive Bildung von Speicherfetten und die lebhaft orange Färbung der sonst grünen Zellen. Dieses Dauerstadium ist sehr widerstandsfähig gegen Kälte, Hitze und Trockenheit und dadurch von großer Bedeutung für die Erhaltung und Verbreitung der Alge. Verbessern sich die Umweltbedingungen und ist Licht vorhanden, wird die Meiose der Zygosporie induziert. Aus der anschließenden Teilung gehen vier vegetative Zellen hervor (Harris, 2009).



### 1.3.1. Ketocarotinoidakkumulation in Grünalgen

Für eine Reihe von Grünalgen war bereits bekannt, dass sie unter Stressbedingungen wie Starklicht, hohen Temperaturen, Trockenheit oder Nährstoffmangel Ketocarotinoide im Stadium der Aplanosporen produzieren (Margalith, 1999; Boussiba, 2000; Orosa et al., 2000; Huang et al., 2006a). Die hinter dieser Akkumulation stehenden Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unerforscht, und auch die biologische Funktion der Ketocarotinoide in Grünalgen ist noch umstritten. So werden sie von manchen Autoren als Lichtschutzpigmente mit „Sonnenschirm“-Funktion gedeutet, von anderen dagegen als Antioxidantien zum Schutz der Zellen gegen oxidative Schädigung (Margalith, 1999; Boussiba, 2000; Lohr, 2009).

Das bekannteste und ökonomisch relevanteste Ketocarotinoid ist Astaxanthin, dessen wichtigste biologische Quelle derzeit die Grünalge *Haematococcus pluvialis* darstellt, die bis zu drei Prozent ihres Trockengewichts an Ketocarotinoiden anreichern kann (Lemoine und Schoefs, 2010). Die Grünalge *Fritschiella tuberosa* akkumuliert dagegen nur ca. 0,3% ihres Trockengewichtes an Ketocarotinoiden (Weber 1975).

Für *C. reinhardtii* wurde erst 2007 gezeigt, dass die orange Färbung der Zygoten durch bisher für *C. reinhardtii* nicht beschriebene Pigmente aus der Gruppe der Ketocarotinoide verursacht wird (Schmidt, 2007; Bauch 2007). *C. reinhardtii* kann also ebenfalls Ketocarotinoide akkumulieren; da dies aber nur in den Zygoten geschieht, eignet sich *C. reinhardtii* nicht zur biotechnologischen Produktion von Ketocarotinoiden. Wesentliche Vorteile von *C. reinhardtii* gegenüber *H. pluvialis* sind jedoch, dass ihr Genom vollständig sequenziert ist und ein umfangreiches molekularbiologisches Methodenarsenal zur Verfügung steht.

Aus den Arbeiten von Schmidt (2007) und Bauch (2007) ergab sich als ein wichtiger Unterschied zwischen *C. reinhardtii* und *H. pluvialis*, dass die Ketocarotinoide in *C. reinhardtii* fast ausschließlich aus 4-Ketolutein (4-Ketolutein) und dessen Fettsäureestern bestehen, während in *H. pluvialis* praktisch nur Astaxanthin und dessen Derivate zu finden sind. Dies ist von Bedeutung, da 4-Ketolutein und Astaxanthin auf getrennten Zweigen der Carotinoidsynthese gebildet werden, dem  $\alpha$ -Carotin- bzw. dem  $\beta$ -Carotin-Ast (siehe Abb. 1). Das Vorkommen von 4-Ketolutein wurde bisher nur in der Grünalge *F. tuberosa* beschrieben, nach der das Pigment auch als Fritschiellaxanthin bezeichnet wird (Weber, 1975). Entsprechend war zunächst noch unklar, inwieweit sich die an *C. reinhardtii* gewonnenen Ergebnisse auf *H. pluvialis* und andere Grünalgen übertragen lassen, in denen bisher nur vom  $\beta$ -Carotin abgeleitete Ketocarotinoide gefunden wurden. Voruntersuchungen zeigten jedoch, dass 4-Ketolutein leicht mit einer Vorstufe von Astaxanthin verwechselt werden kann.

Deshalb lag die Vermutung nahe, dass 4-Ketolutein bei den bisherigen Untersuchungen häufig verwechselt wurde und möglicherweise in vielen Grünalgen gebildet wird.

### **1.3.2. Ketocarotinoidbiosynthese in *H. pluvialis* und *M. zoofingiensis***

Bezüglich der molekularen Grundlagen der Ketocarotinoidakkumulation in Grünalgen waren bisher fast ausschließlich Daten von *H. pluvialis* und *M. zoofingiensis* vorhanden. *H. pluvialis* betreibt beim Vorherrschen schlechter Umweltbedingungen eine starke Neusynthese von Astaxanthin und Lipiden, die in Form von pigmentierten Lipidtröpfchen im Cytosol eingelagert werden. (Grünwald et al., 2000 Grünwald et al., 2001b). Die Pigmente müssen aus dem Chloroplasten exportiert werden. Da die Pigmente nicht wasserlöslich sind, müssen sie von einem hydrophoben Milieu umgeben sein. Grünwald und Hagen (2001a) vermuteten einen Transport der Pigmente über Carotinoidbindeproteine.

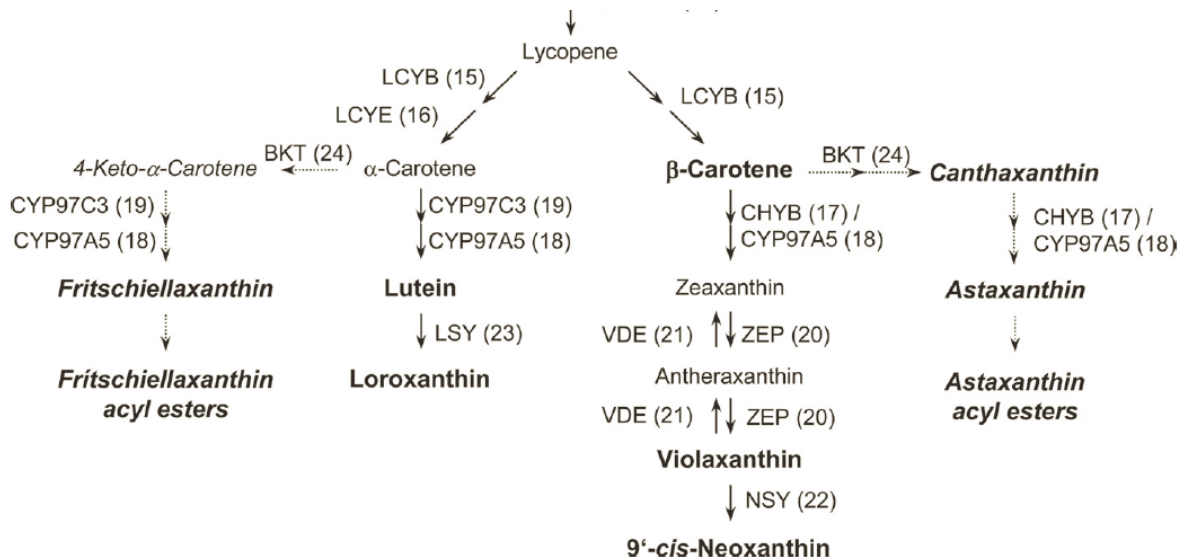
Die BKT aus *H. pluvialis* kann Canthaxanthin zu Astaxanthin ketolieren (Sun et al., 1996), wobei das Enzym nur im Cytosol aktiv ist (Grünwald et al., 2001b). Der Ort der Ketolierungsreaktion ist wahrscheinlich die Hemimembran der Lipidtröpfchen (Grünwald et al., 2001b). Der Biosyntheseweg von Astaxanthin kann ausgehend von  $\beta$ -Carotin theoretisch auf zwei Wegen erfolgen, mit dem Zwischenprodukt Canthaxanthin oder dem Zwischenprodukt Zeaxanthin. Für *H. pluvialis* lassen Inhibitorexperimente darauf schließen, dass Pigmente auf der Stufe des  $\beta$ -Carotins aus dem Plastiden exportiert werden (Grünwald und Hagen, 2001a). In *M. zoofingiensis* dagegen scheint die Astaxanthinsynthese über Zeaxanthin zu verlaufen (Huang et al., 2006b). Das Gros der Ketocarotinoide liegt in den Dauerstadien von Grünalgen nicht in freier Form, sondern verestert mit Fettsäuren vor. Bisher sind keine Daten zu dem für die Acylierung der Ketocarotinoide verantwortlichen Enzym bzw. den beteiligten Enzymen vorhanden.

### **1.3.3. Ketocarotinoidbiosynthese in *C. reinhardtii***

Zur Ketocarotinoidbiosynthese in *C. reinhardtii* war zur Beginn der Arbeit erst sehr wenig bekannt. Der Plastid von *C. reinhardtii* enthält im vegetativen Stadium vor allem die Pigmente Chlorophyll a und b,  $\beta$ -Carotin, Lutein, Loroaxanthin, Neoxanthin und Violaxanthin, wobei  $\beta$ -Carotin und Lutein zusammen ungefähr die Hälfte der Gesamtcarotinoide ausmachen. Abgesehen von Loroaxanthin besitzt *C. reinhardtii* die gleiche Pigmentausrüstung wie Gefäßpflanzen, und entsprechend finden sich im Genom von *C. reinhardtii* homologe Gene zu den meisten aus Gefäßpflanzen bekannten Carotinoidbiosyntheseenzymen (Lohr et al., 2005; Lohr, 2009).

Ausgehend von  $\alpha$ -Carotin und  $\beta$ -Carotin kommen in *C. reinhardtii* drei mögliche Kandidaten für deren Hydroxylierung zu Lutein bzw. Zeaxanthin in Betracht, die beiden Cytochrom P450-Hydroxylasen CYP97A5 und CYP97C3 sowie eine Häm-freie Eisen-II-Monooxygenase CHYB (Lohr, 2009). Die Funktion dieser drei Enzyme aus *C. reinhardtii* wurde bisher nicht untersucht, aber für die homologen Enzyme aus *Arabidopsis thaliana* liegen entsprechende Daten vor. Die CHYB aus *A. thaliana* kann  $\beta$ -Iononringe an der Position C3 hydroxylieren und ist für die Synthese von Zeaxanthin aus  $\beta$ -Carotin verantwortlich (Sun et al., 1996). Die Cytochrom P450-Hydroxylase CYP97A3 katalysiert durch Hydroxylierung des  $\beta$ -Iononrings von  $\alpha$ -Carotin dessen Umwandlung zu Zeinoxanthin, vermag jedoch nicht den  $\beta$ -Iononring des  $\beta$ -Carotins zu hydroxylieren (Kim und DellaPenna, 2006). Die CYP97C1 aus *A. thaliana* schließlich hydroxyliert den  $\epsilon$ -Iononring von  $\alpha$ -Carotin oder von Zeinoxanthin an der Position 3 (Tian et al., 2004). Durch die Hydroxylierung der beiden Iononringe entsteht Lutein.

Für die Enzyme Violaxanthindeepoxidase (VDE) und Neoxanthinsynthase (NSY) konnten in *C. reinhardtii* bisher keine Kandidaten identifiziert werden, jedoch ist die Präsenz eines Violaxanthinzyklus unstrittig. Auch das Loroanthinsynthase-Enzym (LSY), das die Hydroxylierung des Luteins an der Position 9 zu Loroanthin katalysiert, ist nicht bekannt (Lohr, 2009). Zeaxanthin kann durch die Zeaxanthinepoxidase (ZEP) zu Violaxanthin umgesetzt werden (Baroli et al., 2003 für *C. reinhardtii*). Diese vier Enzyme sind allerdings an der Bildung der Ketocarotinoide nicht beteiligt



**Abb. 1** Ausschnitt aus dem potentiellen Biosyntheseweg der Carotinoide in *C. reinhardtii*; aus Lohr (2009). Die Enzymfunktion wurde auf Grund von Sequenzvergleichen mit Enzymen bereits bekannter Funktion hergeleitet, oder wurde noch nicht identifiziert (LSY, VDE, NSY). Bei den Enzymen handelt es sich um die Lycopin- $\beta$ -Zyklase (LCYB), Lycopin- $\epsilon$ -Zyklase (LCYE), Carotin- $\beta$ -Hydroxylase (CHYB), Carotin- $\beta$ -Hydroxylase (CYP97A5), Carotin- $\epsilon$ -Hydroxylase (CYP97C3), Loroxanthin-Synthase (LSY), Violaxanthin-Deepoxidase (VDE), Neoxanthinsynthase (NSY), Zeaxanthin-Epoxidase (ZEP), Carotin- $\beta$ -Ketolase (BKT).

Die Ketolierung von Carotinoiden in *H. pluvialis* katalysiert eine  $\beta$ -Carotin-Ketolase (BKT). In *C. reinhardtii* wurde ein homologes Gen in EST-Sequenzen entdeckt (Lohr, 2005). Erst daraufhin wurde nach Ketocarotinoiden in *C. reinhardtii* gesucht. Schmidt (2007) konnte die BKT amplifizieren und zwischenklonieren. Bauch (2007) konnte in carotinogenen *E. coli*-Bakterien erste Tests mit den Substraten  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin durchführen und zeigte, dass Canthaxanthin und Astaxanthin synthetisiert werden kann, wobei offen blieb, ob die Synthese von  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin über Canthaxanthin oder Zeaxanthin verläuft. Ebenso konnte aufgrund des Fehlens geeigneter Bakterienstämme bisher nicht untersucht werden, ob die BKT möglicherweise auch das Enzym für die Katalyse von 4-Ketolutein ist. Schoefs et al. (2001) schlossen aus Hemmstoffversuchen, dass an der Synthese von Astaxanthin in *H. pluvialis* auch eine Cytochrom P450-Hydroxylase beteiligt ist. Lohr (2009) vermutete deshalb, dass die CYP97A5 in *C. reinhardtii* möglicherweise auch die  $\beta$ -Iononringe von  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin hydroxylieren kann (Abb. 1). Bisher ist aber kein Cytochrom P450-Enzym aus Grünalgen funktionell charakterisiert worden.

#### 1.4. Ziele der Promotionsarbeit

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von *C. reinhardtii* als Modell zur Klärung zentraler Fragen des Metabolismus und der Funktion von Ketocarotinoiden in Grünalgen. Dazu sollte in der hier vorliegenden Arbeit der Syntheseweg der Ketocarotinoide in den Zygoten von *C. reinhardtii* untersucht und mit den für *H. pluvialis* vorliegenden Ergebnissen verglichen werden. Um die Übertragbarkeit der an *C. reinhardtii* gewonnenen Erkenntnisse auf andere Grünalgen zu überprüfen, sollen außerdem die Ketocarotinoidprofile mehrerer bekannter ketocarotinoid-produzierender Grünalgen nochmals untersucht werden.

Für mein Promotionsvorhaben ergaben sich in diesem Kontext die folgenden konkreten Fragestellungen:

1. Wie verbreitet ist die Fähigkeit zur Synthese des bisher nur aus einer Grünalge beschriebenen Ketocarotinoids 4-Ketolutein innerhalb der Gruppe der Grünalgen?
2. Verläuft die Biosynthese von  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin in *C. reinhardtii* über Canthaxanthin oder Zeaxanthin?
3. Kann das BKT-Enzym aus *C. reinhardtii* auch die Substrate  $\alpha$ -Carotin und  $\beta$ -Carotin ketolieren?
4. Welche Substrate können die drei potentiellen Carotinoid-Hydroxylasen aus *C. reinhardtii* hydroxylieren?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte

Eine Liste der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte befindet sich im Anhang.

### 2.2. Chemikalien

#### 2.2.1. Chemikalien und Bezugsquellen

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen und entsprachen dem Analysen-Reinheitsgrad. Die für die Extraktion der Pigmente eingesetzten Lösungsmittel sowie die der mobilen Phase der HPLC entsprachen dem Reinheitsgrad für HPLC. Der beim Arbeiten mit Pigmenten eingesetzte gasförmige Stickstoff stammte von der Firma LINDE, Mainz- Kostheim.

#### 2.2.2. Primer

Alle Primer wurden über die Firma Biomers.net, Ulm bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden zunächst nach den Konzentrationsangaben des Herstellers mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf 100 µM aufgefüllt, anschließend zu einer 3 µM Gebrauchslösung mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3. Polymerasen

<b>Polymerase</b>	<b>Hersteller</b>
GC-Rich PCR System	Roche (Penzberg)
KAPA2G Robust PCR Kit	PeqLab (Erlangen)
Phusion™-High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes (Espoo, Finnland)
Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Finnzymes (Espoo, Finnland)
Taq-DNA-Polymerase	PeqLab (Erlangen)

## 2.2.4. Plasmide

Name	Weitere Bezeichnung	Beschreibung	Haupt-Carotinoid
pZEAX	pACCAR25 $\Delta$ crtX	Misawa et al.1995	Zeaxanthin
pLYCO II	pACCAR25 $\Delta$ crtX,Y,Z	siehe Ergebnisteil	Lycopin
pBETA II	pACCAR25 $\Delta$ crtX,Z	siehe Ergebnisteil	$\beta$ -Carotin
pRUBI	pACCAR25 LCYB $\Delta$ crtX,Y,Z	siehe Ergebnisteil	Rubixanthin/ Zeaxanthin
pGAMMA	pACCAR25 LCYB $\Delta$ crtX,Y	siehe Ergebnisteil	$\gamma$ -Carotin/ $\beta$ -Carotin
pALPHA	pACCAR25 OluLCY $\Delta$ crtX,Y,Z	siehe Ergebnisteil	$\alpha$ -Carotin
pLUT	pACCAR25 OluLCY $\Delta$ crtX;Y	siehe Ergebnisteil	Lutein, Zeinoxanthin
pCANTHA	pACCAR25 CrBKT $\Delta$ crtX,Z	siehe Ergebnisteil	Canthaxanthin

Name	Beschreibung
pCW-hNPR	siehe Ergebnisteil
pCW-CYP97A5-hNPR	siehe Ergebnisteil
pCW-CYP97C3-hNPR	Elbers (2011)
pBAD_CYP97C3	siehe Ergebnisteil
pCW-CYP97A6-hNPR	Elbers (2011)
pBAD_CYP97A6	siehe Ergebnisteil
pBAD_CrBKT5.1	Bauch (2007)
pBAD_CrCHYB	Bauch (2007)
pBAD_LCYB	siehe Ergebnisteil
pBAD_LCYE	Plew (2008)
pBAD_OluLCY	siehe Ergebnisteil
pBAD_OluLCY	siehe Ergebnisteil
pBAD_crtZ	siehe Ergebnisteil
pBAD_crtZ $\Delta$ Prä	siehe Ergebnisteil

Name	Bezugsquelle
pBAD-TOPO TA	Invitrogen, Karlsruhe
pGEM	Promega
pChlamiRNA2	Chlamydomonas Resource Center at University of Minnesota, St. Paul, MN, USA
pChlamiRNA3	Chlamydomonas Resource Center at University of Minnesota, St. Paul, MN, USA
pChlamiRNA3int	Chlamydomonas Resource Center at University of Minnesota, St. Paul, MN, USA

### 2.2.5. Antibiotika

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Vorratslösung
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol (Cm)	34 µg/ml	34 mg/ml in Ethanol
Kanamycin (Kan)	30 µg/ml	30 mg/ml in H <sub>2</sub> O

### 2.2.6. Restriktionsenzyme

Die für diese Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Fermentas und NEB bezogen und nach Angaben der Hersteller eingesetzt.

### 2.2.7. Referenzpigmente

Die Referenzpigmente Astaxanthin,  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin und Canthaxanthin wurden über die Firma BASF (Ludwigshafen) bezogen. Ein  $\alpha$ -,  $\beta$ -Carotiningemisch erhielt ich von Lohr, Uni-Mainz, so wie Lutein von Hobe, Uni Mainz.

## 2.3. Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1. Steriles Arbeiten

Algen und Bakterien erfordern steriles Handling. Die Arbeiten erfolgten unter einer Laminarflow Workstation (Microflow, Nunc). Gefäße, Instrumente und Medien wurden im Autoklaven (Systec) für 20 min bei 1 bar dampfsterilisiert. Nicht autoklavierbare



Gegenstände wurden mit 70%igem Ethanol oberflächensterilisiert, Flüssigkeiten mittels 0,2 µm Sterilfilter (Sartorius) sterilfiltriert.

### 2.3.2. Mikroorganismen

#### Algen

Organismus	Stamm	mt	Zusatz	Erhalten von
<i>C. reinhardtii</i>	cc621	-	WT mating effizient	Arbeitsgruppe
<i>C. reinhardtii</i>	cc620	+	WT mating effizient	Arbeitsgruppe
<i>C. reinhardtii</i>	cw15			G. Kreiner
<i>C. reinhardtii</i>	cw15 329arg 7-			M. Schroda, Max-Planck-Institut, Potsdam
<i>Muriella zofingiensis</i>	SAG 211-14			SAG, Göttingen
<i>Muriella zofingiensis</i>	SAG 34-80			SAG, Göttingen
<i>Volvox carteri</i>				A. Hallmann, Universität Bielefeld
<i>Hydrodictyon reticulatum</i>				Arbeitsgruppe
<i>Fritschiella tuberosa</i>	SAG 112-80			SAG, Göttingen
<i>Scenedesmus rubescens</i>	SAG 5-95			SAG, Göttingen
<i>Haematococcus pluvialis</i>	SAG 192-80			SAG, Göttingen

#### Bakterien

Organismus	Stamm	Erhalten von
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue (supercompetent, homemade)	Arbeitsgruppe
<i>Escherichia coli</i>	One Shot TOP10 Competent Cells	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i>	α-Select, Electrocompetent	Bioline, London
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α (supercompetent, homemade)	Arbeitsgruppe

Bei den in der vorliegenden Arbeit als carotinogene Bakterien bezeichneten Organismen handelt es sich um XL1-Blue-Zellen, Top10-Zellen bzw. DH5α Zellen, die auf einem zusätzlichen Plasmid die Gene zur Produktion von Carotinoiden enthalten, die konstitutiv exprimiert werden. Die entsprechenden Plasmide sind unter dem Punkt Chemikalien aufgelistet und im Detail im Anhang dargestellt.

### 2.3.3. Kultivierung von Mikroalgen

Die Anzucht der Algen erfolgte in TAP-Medium in 200ml Ansätzen im 500 ml Erlenmeyerkolben als Schüttelkulturen bei 120 rpm oder zur Lagerung auf Festmedium (1,5 % Bacto-Agar, Otto Nordwald) bei 60-80  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und einem Tag / Nacht-Rhythmus von 16 / 8. Zur Vermeidung von Bakterienbewuchs wurde den Medien 100  $\mu\text{molar}$  Ampicillin (Roth) zugesetzt, da dies für die Algenkulturen unbedenklich ist (Harris, 2009) und keinen Einfluss auf die Pigmentzusammensetzung der Zygosporien von *C. reinhardtii* hat (Werner, 2011). Für *H. pluvialis* wurde statt des TAP-Mediums Desmidiaceenmedium (Schlösser, 1994) verwendet.

### Herstellung von Aplanosporen

Die Aplanosporen bildeten sich als eine Folge des Aufbrauchs der Nährstoffe im Kulturmedium. Dazu wurden die Kulturen ohne Mediumswechsel für ca. 12 Wochen inkubiert

### Herstellung von *C. reinhardtii*-Zygoten

Zur Gameteninduktion wurden 4 Tage alte Flüssigkulturen bei 1500 x g für 10 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert und in stickstofffreiem TAP-N resuspendiert. Die Gametogenese war nach 16-24 Stunden bei 70  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  abgeschlossen.

Zur Paarung wurden Gameten der beiden Paarungstypen bei 1500 x g für 10 Minuten abzentrifugiert und in stickstofffreiem TAP-N auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^8$  resuspendiert und vereint. Die Proben wurden für 2 Stunden bei 70  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  belichtet. Anschließend wurde der Ansatz auf 3%igen TAP-N-Agar-Platten ausplattiert und unter dem Luftstrom der Sterilbank angetrocknet. Danach erfolgte eine Inkubation bei 70  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  für 24 Stunden. Zur Zygotenreifung wurden die Proben in Alufolie lichtdicht verpackt und bei 20 °C gelagert.

### 2.3.4. Kultivierung von Bakterien

Für die Anzucht von Bakterien fand als Flüssignährmedium steriles LB-Medium Verwendung (Zusammensetzung siehe Anhang). Wenn notwendig wurde Antibiotika aus der Antibiotika-Stammlösung im Verhältnis 1:1000 vor der Verwendung frisch zugesetzt. Grundsätzlich wurden die Bakterien bei 37 °C im Kulturrad oder im Inkubationsschüttler bei 200 rpm

kultiviert, mit Ausnahme der Expressionen von Carotinogenen XL1-Blue-Zellen, die bei 28 °C stattfanden.

Als Festmedium wurden LB-Platten (Zusatz von 1,5% Difco Agar) verwendet. Bei der Herstellung der Platten wurde dem 60 °C warmen Agar unmittelbar vor dem Gießen der Platten 100 µg/ml steriles Ampicillin zugesetzt. Die Platten wurden nach dem Abkühlen bei 4 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37 °C über Nacht im Brutschrank. Anschließend wurden die Plattenkulturen mit Parafilm versiegelt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Für Festmedien, die zusätzlich noch ein weiteres Antibiotikum benötigten, wurden 15 Minuten vor der Verwendung 20 µl Chloramphenicol (34 mg/ml in Ethanol) bzw. Kanamycin (30 mg/ml in H<sub>2</sub>O) zusammen mit 80 µl sterilem dH<sub>2</sub>O ausgestrichen.

Für die Charakterisierungen der Cytochromenzyme wurde modifiziertes TB-Medium inklusive Tace-Elements (Prichard, 2006) verwendet.

### **2.3.5. Bestimmung der Zelldichte**

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde bei einer OD von 600 nm mit dem Eppendorf Biophotometer V1.20 bestimmt. Als Nullabgleich diente LB-Medium.

### **2.3.6. Lichtmikroskopische Untersuchungen**

Lichtmikroskopischen Arbeiten inklusive von Zellzählungen wurden mit dem Durchlichtmikroskop Axioplan (Zeiss) durchgeführt. Untersuchungen unter sterilen Bedingungen erfolgten auf der Sterilbank mit einem Auflichtmikroskop (Olympus).

### **2.3.7. Zellzählung**

Jeweils 1,5 ml Algenkultur wurde mit 10 µl einer 1 %igen Lugolschen-Lösung versetzt, um die mobilen Zellen zu immobilisieren. Die Auszählung erfolgte unter dem Mikroskop Axioplan (Zeiss) bei 200facher Vergrößerung mit der Einmal-Zählkammer C-Chip DHC-NO1, Neubauer improved, Peqlab.

### **2.3.8. Herstellung von kompetenten Zellen**

Superkompetente Zellen wurden mit der CaCl<sub>2</sub>-Methode nach Sambrook and Russel (2001) hergestellt.

### 2.3.9. Transformation

50 µl chemisch kompetente Bakterien (Top10/ DH5α-/ XL1-Blue-Zellen) wurden auf Eis aufgetaut und mit 2-6 µl TOPO Ligationsansatz, bzw. 10 ng Plasmid-DNA bei Plasmidtransformationen versetzt und durch leichtes Anstupsen des Reaktionsgefäßes vermischt. Anschließend wurde der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 45 sekündiger Hitzeschock bei 42 °C. Die Probe wurde danach sofort wieder auf Eis gestellt. Damit die Zellen die Resistenz-Proteine exprimieren konnten, erfolgte die Inkubation mit 225 µl LB-Medium ohne Antibiotika für 1h bei 37 °C auf dem Schüttler bei 200 rpm. 150 µl dieses Transformationsansatzes wurden auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei den carotinogenen XL1-Blue-Zellen wurden die Platten mit einem weiteren Antibiotikum versetzt (20 µl 34 mg/ml Chloramphenicol)

### 2.3.10. Dauerkulturen

Wichtige Transformanten wurden als Dauerkultur konserviert. Dazu wurden 850 µl einer frischen Übernachtskultur mit 150 µl 80%igem sterilem Glycerin versetzt, gut gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.3.11. Vernichtung von Bakterienkulturen

Nicht mehr benötigte Bakterienkulturen wurden mittels Autoklaven/Dampfsterilisation abgetötet. Verwendete Materialien, die mit den Kulturen in Berührung kamen, wurden ebenfalls autoklaviert oder mit Alkohol desinfiziert.

### 2.3.12. Überexpression

Die zu induzierenden Bakterien wurden mit den entsprechenden Antibiotika in LB-Medium angezogen. Bakterienzellen die einen pCW-Vektor enthielten wurden mit 1 mM IPTG induziert. Zellen mit dem pBAD-TOPO-Vektor wurden mit Arabinose induziert. Die Endkonzentration lag zwischen 0,1 % und 0,005 %. Der Start der Induktion erfolgte standardmäßig bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6, wenn nicht anders angegeben. Für Pigmentanalysen mit den carotinogenen *E. coli*-Zellen hatte sich eine Temperatur von 28 °C bewährt. Für die Probeentnahme nach mehreren Zeitpunkten wurden 200 ml LB-Medium in 500 ml Kolben angeimpft, über Nacht bei 28 °C inkubiert und am nächsten Tag induziert. Für Einzelmessungen wurden die Bakterien in 50 ml PP-Röhrchen (Greiner Bio-One) mit 15 ml

LB-Medium angezogen. Zwecks Belüftung wurde der Deckel schräg aufgelegt und mit Klebeband fixiert.

## **2.4. Biochemische Methoden**

### **2.4.1. Isolierung von Pigmenten aus Bakterienproben**

Beim Standardtest wurden 10 ml Bakterienkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 1,4 durch Abzentrifugieren in 15 ml PP-Röhrchen (Greiner Bio-One) bei 8000 x g, 4 °C für 4 Minuten geerntet und der Überstand verworfen. Um die wässrige Phase restlos zu entfernen wurde ein weiteres Mal für 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgezogen. Anschließend wurde das Pellet durch abwechselndes vortexen und Ultraschallbad in 200 µl Methanol resuspendiert. Dadurch wurde ein Aufbrechen der Zellmembranen und ein partielles Lösen der Pigmente erreicht. Durch Zusatz von 200 µl Dichlormethan sowie erneutes Vortexen und die Verwendung von Ultraschall wurden die Pigmente aus den Membranen gelöst. Bei Verwendung der HPLC-Methode 3 konnte 200 µl Aceton zugesetzt werden, um die Pigmente stabil in Lösung zu halten. Bei der Verwendung der C18-Säule (HPLC-Methode 1 und 2) störte das Aceton. Hier mussten 200 µl MeOH zugesetzt werden, um eine Phasentrennung zu vermeiden. Außerdem musste der Extrakt umgehend in der HPLC analysiert werden, da sonst die Gefahr bestand, dass unpolare Pigmente ausfielen. Zelltrümmern und weiteren Störpartikeln wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 11000 x g und 10 °C pelletiert. Der Überstand wurde direkt in die HPLC injiziert.

### **2.4.2. Isolierung von Pigmenten aus Mikroalgen**

Die Zygosporien von *C. reinhardtii* wurden durch Abschaben mit Zellschabern (Cell Scrapper, 28 cm, Greiner Bio-One) vom Festmedium separiert und in dH<sub>2</sub>O aufgenommen, nachdem Gamentenrückstände vorher mit dH<sub>2</sub>O weggespült wurden. Das Entfernen der Gameten war möglich, da die Zygoten im Gegensatz zu den Gameten leicht in das Festmedium einsanken. Algen aus Flüssigkultur wurden direkt mittels Wasserstrahlpumpe auf Filter (GF6 Glasfaser Filter, Schleicher und Schuell, Dassel) abfiltriert. Die Filter wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert. Der Zellaufschluss und die Extraktion der Pigmente erfolgte, indem 1-2 Filter zusammen mit 1 ml Dichlormethan und Methanol (2:7) und einem Glasperlengemisch (Durchmesser von 1-1,05 mm und 0,25-0,3 mm im Gewichtsverhältnis 1:1) in eine Glasflasche des Zellhomogenisators (B. Braun,

Melungen) gegeben wurden und für zweimal 30 sec auf der Stufe 2 unter Kühlung mit flüssigem CO<sub>2</sub> mazeriert wurden.

Der Überstand wurde abgenommen. Der verbliebene Rest wurde mit dem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH-Gemisch nachextrahiert bis das Pellet farblos war. Die Fraktionen wurden anschließend vereint und bis zu ihrer Verwendung im Dunkeln bei -20 °C gelagert.

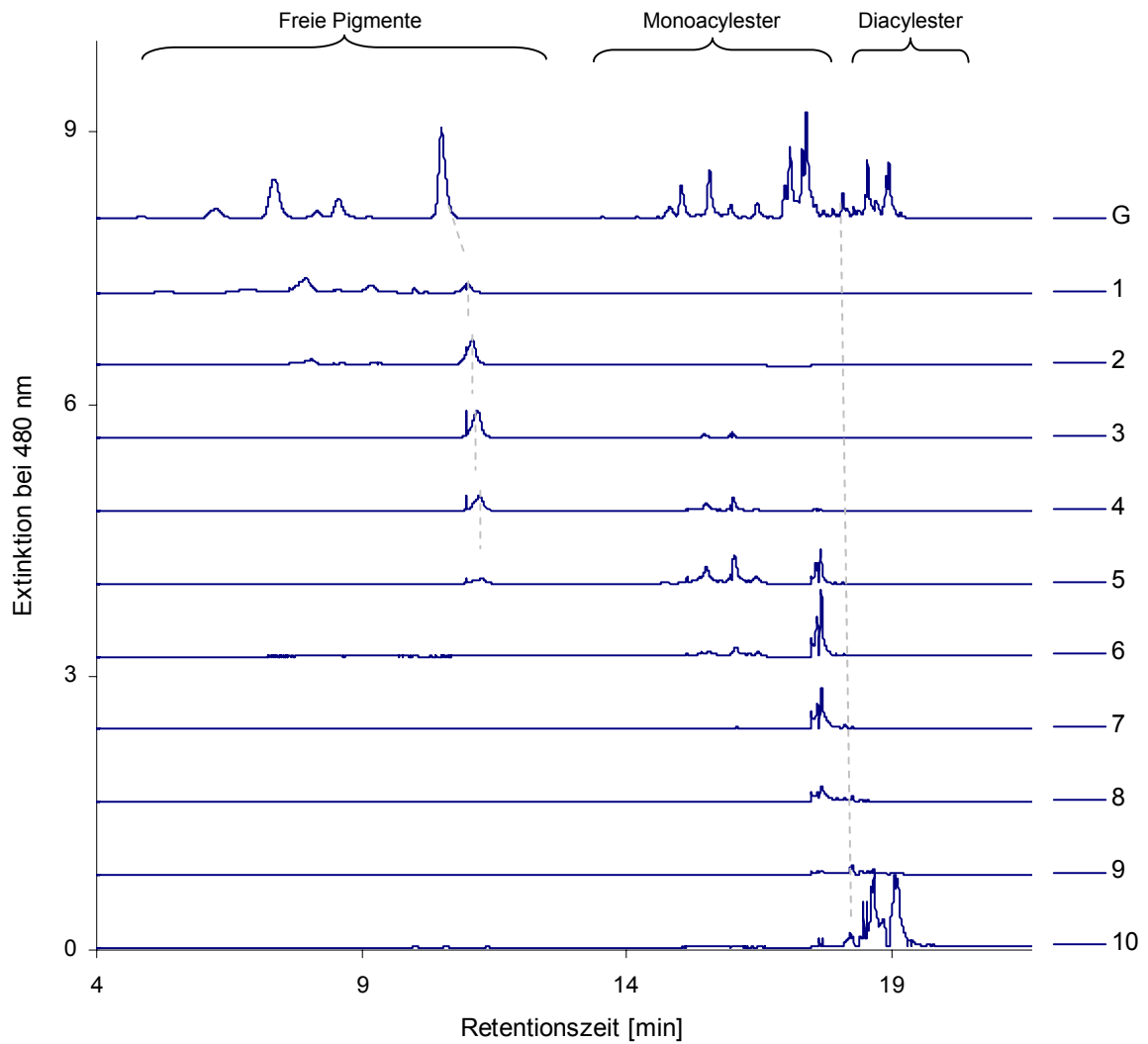
### 2.4.3. Fraktionierung von Pigmentextrakten aus Mikroalgen

Wie aus dem Kapitel 3.1 ersichtlich, konnten die Pigmente aus den Dauerstadien von Grünalgen in den mit HPLC-Methode 2 erstellten Chromatogrammen drei verschiedenen Polaritätsebenen zugeordnet werden, die mit ihrer chemischen Struktur korrespondieren. Der erste Polaritätsbereich bestand aus freien Pigmenten wie z. B. Astaxanthin, Lutein und Canthaxanthin, der zweite Bereich enthielt vor allem Carotinoid-Fettsäure-Monoester. Im zweiten Polaritätsbereich waren zudem Chlorophyll a und b sowie Echinenon feststellbar. Der dritte Polaritätsbereich, der die Carotinoid-Fettsäure-Diester enthielt, war vom zweiten Teil durch  $\beta$ -Carotin abgegliedert. Um diese Bereiche getrennt untersuchen zu können wurden die Pigmentextrakte mit mit SepPak C18+ -Säulen der Firma Waters fraktioniert. Drei Säulen wurden ineinander gesteckt und 1,5 ml Rohextrakt mittels einer Einwegspritze aufgetragen. Anschließend wurde mit 1 ml dH<sub>2</sub>O, mit 2 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (1:6), 1 ml MeOH gespült. Die Elution erfolgte beginnend mit 3,5 ml MeOH, 3 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1:9), 2 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1:6), 1,5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Dabei wurden Proben mit einem Volumen von jeweils 1 ml abgenommen.

In der Abb. 2 ist beispielhaft für die Fraktionierung von Pigmentextrakten aus Dauerstadien der Chlorophyta die Separation der Ketocarotinoid-Monoester und -Diesterfraktion aus Dauerstadien von *S. rubescens* dargestellt. In den Fraktionen 1 bis 3 waren die freien Pigmente enthalten, in denen sich keine Monoester fanden. Die Fraktion 4 enthielten neben Monoestern vor allem das freie Pigment Canthaxanthin. Das Gros der Monoester war in den Fraktionen 5, 6 und 7 enthalten. Die Fraktionen 8 und 9 waren gering konzentriert und enthielten vor allem  $\beta$ -Carotin, wenig Mono- und wenig Diester. Die Fraktion Nr. 10 enthielt sämtliche Diester in hoher Konzentration sowie einen Anteil an  $\beta$ -Carotin.

Zur Analyse der Monoester (zweiter Polaritätsbereich) wurden die Fraktionen 5-7 zu einer im Folgenden als Fraktion I bezeichneten Fraktion vereint und der Verseifung zugeführt, um die Fettsäurereste von den Carotinoiden zu spalten und die Pigmente in ihrer freien Form untersuchen zu können. Entsprechend wurde mit der Fraktion 10 verfahren, welche die

Carotinoiddiester enthielt (dritter Polaritätsbereich) und in den Analysen als Fraktion II bezeichnet wurde.



**Abb. 2** Chromatogramme der Fraktionierung eines Pigmentextraktes aus Aplanosporen der Grünalge *S. rubescens*. Im ersten Chromatogramm ist der Gesamtextrakt (G) dargestellt. Die Fraktionen 1-10 stellen Fraktionen des Gesamtextraktes da, die mit SEP-Pack C18-Säulen hergestellt wurden. Das Elutionsvolumen umfasste jeweils 1 ml. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 1 erstellt.

### **2.4.4. Verseifung von Pigmentfraktionen aus Mikroalgen**

1 ml einer nicht bestimmten Menge Pigmentextrakt wurde mit 4 ml MeOH und 1 ml CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> versetzt und mit N<sub>2</sub> durchsprudelt, anschließend 1 ml einer 0,2% NaOH in MeOH zugesetzt und im Dunkeln sowie unter Stickstoffatmosphäre für 16 Stunden bei Raumtemperatur verseift. Es war darauf zu achten, dass der Stickstoff nur sehr langsam durch das Lösungsmittel perlte, da die Gefahr bestand, daß das Lösungsmittelgemisch sonst verdunstet und die Konzentration an NaOH zu hoch würde.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Ausschütteln mit 8 ml Diethylether unter der Zugabe von NaCl (5 M) bis die Lösung ausflockte. Etherphase und Mischphase wurden in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde die wässrige Phase nochmals mit Ether ausgeschüttelt und die Etherphase inklusive der Mischphase abgenommen. Die beiden organischen Phasen wurden vereint und zweimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Bei einer Trübung der Etherphase wurde erneut NaCl zugegeben und ausgeschüttelt. Zum Schluss wurde die pigmenthaltige organische Phase in einem frischen Gefäß mit N<sub>2</sub> eingetrocknet.

Die Kontrolle wurde mit dem gleichen Rezept erstellt. Statt NaOH haltigem MeOH wurde reines MeOH eingesetzt.

Zur Vorbereitung für die Pigmentanalyse mittels HPLC wurden die getrockneten Pigmente in HPLC-Extraktionsmedium (81 % Methanol, 11 % Ethylacetat, 10% H<sub>2</sub>O, 75 mM Ammoniumacetat) gelöst und anschließend mit der HPLC-Methode 2 analysiert.

### **2.4.5. Selektive Reduktion von Pigmentextrakten mit NaBH<sub>4</sub>.**

Die zu reduzierenden Pigmentextrakte lagen üblicherweise in getrockneter Form vor und wurden zunächst in Methanol gelöst. Zur selektiven Reduktion der Keto- und Aldehydgruppen wurden 25 mg Natriumborhydrid in 1 ml Methanol gelöst und der Pigmentlösung im Verhältnis 1:20 zugesetzt. Zur unvollständigen Reduktion wurde die Reaktion nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch Ausschütteln abgestoppt. Für die vollständige Reaktion wurde die Reaktionszeit unter gleichen Bedingungen auf 2 Stunden verlängert. Die Analyse des Pigmentgemischs erfolgte nach dem Eintrocknen unter Stickstoffstrom und Aufnahme in MeOH in der HPLC mittels der HPLC-Methode 2 und HPLC-Methode 3.



**2.4.6. Thermische Isomerisierung von 4-Ketolutein**

Das experimentelle Vorgehen erfolgte in Anlehnung an die thermische *trans-cis*-Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin (Marx, 2003). Eine nicht definierte Menge unter Stickstoffstrom getrocknetes 4-Ketolutein wurde in 400  $\mu$ l Toluol aufgenommen und für 15 Minuten in einem Glasgefäß bei 105 °C im Heizblock inkubiert. Nach dem Abkühlen der Probe auf Eis wurde die Pigmentlösung mit der vierfachen Menge an Methanol verdünnt und 200  $\mu$ l davon in die HPLC injiziert. Die Pigmentanalyse wurde mit der HPLC-Methode 3 und HPLC-Methode 2 vorgenommen.

### **2.5. Pigmentanalytik**

#### **2.5.1. Photometrische Pigmentuntersuchung**

Photometrische Pigmentuntersuchungen erfolgten im Zweistrahlphotometer MPS-2000 (Shimadzu, Japan) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden Spektren zwischen 350 und 700 nm aufgenommen.

#### **2.5.2. Anlagenspezifikation HPLC**

In der vorliegenden Arbeit wurde das Separations-Modul Waters Alliance HT 2795 mit den Säulen und Chromatographiemethoden, wie nachfolgend ersichtlich, eingesetzt. Die Detektion der Pigmente erfolgte je nach Methode im Spektralbereich von 250-700 nm mit dem gekoppelten Waters 2996 Photodiode Array Detector und die Chromatogramme wurden bei einer für Carotinoide charakteristischen Wellenlänge von 440 nm bzw. 480 nm quantitativ ausgewertet. Das Steuern der Anlage, die Datenaufzeichnung und die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Software Empower Pro (Waters).

#### **2.5.3. Probenvorbereitung HPLC**

Um auch scharfe Peaks bei den Pigmenten mit kurzer Retentionszeit zu erhalten, hatte es sich bei der Pigmentanalyse mit den HPLC-Methoden 1 und 2 bewährt, dem in HPLC-Extraktionsmedium gelösten Pigmentextrakt mit einem Anteil von 20% ddH<sub>2</sub>O zu versetzen und so schnell wie möglich auf die Säule zu applizieren. Bei in Methanol gelöstem Pigmentextrakt konnte bis zu 40% ddH<sub>2</sub>O verwendet werden. Methanol-Dichlormethangemische als Lösungsmittel ergaben bei den Pigmenten mit kurzen Retentionszeiten keine sehr scharfen Peaks, hiermit konnten aber auch die sehr unpolaren Pigmente für längere Zeit stabil in Lösung gehalten werden.

Die C30-Säule war gegenüber den Lösungsmitteln etwas unkritischer. Daher konnte hier ein Gemisch von Methanol, Dichlormethan und Aceton im Verhältnis 1:1:1 ohne Wasserzusatz verwendet werden, in dem die Pigmente auch über einen Zeitraum von mindestens 20 h bei 10 °C stabil in Lösung blieben, was die Analyse größerer Probenaufkommen erleichterte.

#### 2.5.4. HPLC-Methoden

Nachfolgend werden die HPLC-Methoden beschrieben, die für die Auftrennung der Pigmentgemische verwendet wurden.

##### HPLC-Methode 1:

Säule:

Chromolith Performance RP-18e 100-4,6mm (Merck) & Chromolith Guard Cartridge Kit RP-18e 100-4,6mm (Merck)

Eluenten:

Eluent A: 85 % (v/v) Methanol, 15 % ddH<sub>2</sub>O, 0,075 M Ammoniumacetat

Eluent B: 90 % (v/v) Acetonitril, 10 % ddH<sub>2</sub>O

Eluent C: 100% Ethylacetat

Gradient:

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
0	1,5	10	30	-
4	1,5	-	100	-
10	1,5	-	80	20
15	1,5	-	60	40
17	1,5	-	30	70
22	1,5	-	30	70
23	1,5	-	100	-
24	1,5	70	30	-

Bandbreite der Online-Detektion:

350-700 nm

##### HPLC-Methode 2:

Säule:

Chromolith Performance RP-18e 100-4,6mm (Merck) & Chromolith Guard Cartridge Kit RP-18e 100-4,6mm (Merck)

## MATERIAL UND METHODEN

---

Eluenten:

Eluent A: 85 % (v/v) Methanol, 15 % ddH<sub>2</sub>O, 0,075 M Ammoniumacetat

Eluent B: 90 % (v/v) Acetonitril, 10 % ddH<sub>2</sub>O

Eluent C: 100% Ethylacetat

Gradient:

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
0	1	70	30	-
4	1	-	100	-
10	1	-	80	20
13	1	-	60	40
22	1	-	45	55
25	1	-	30	70
29	1	-	30	70
30	1	-	100	-
31	1	70	30	-

Bandbreite der Online-Detektion:

350-700 nm

### HPLC-Methode 3:

Säule:

Prontosil 200-5-C30 5µm, NC (250x 4,6 mm) & K2 (20x 4,0 mm) (Bischoff Chromatography, Leonberg)

Eluenten:

Eluent A: 85 % (v/v) Methanol, 15 % ddH<sub>2</sub>O, 0,075 M Ammoniumacetat

Eluent B: 90 % (v/v) Acetonitril, 10 % ddH<sub>2</sub>O

Eluent C: 100% Ethylacetat

Gradient:

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
0	1,3	10	90	-
0,75	1,3	-	100	-
2,5	1,3	-	60	40
8	1,3	-	50	50
23	1,3	-	10	90
26	1,3	-	10	90
26,5	1,3	-	-	100
30	1,3	-	-	100
32	1,3	-	100	-
33	1,3	10	90	-

Bandbreite der Online-Detektion:

270-700 nm

### 2.5.5. Pigmentidentifizierung/ Eichung der HPLC-Anlage

Stellt man die Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge der Zeit gegenüber, so kann aus der Integration der Pigmentpeaks auf die Konzentration des entsprechenden Pigments geschlossen werden. Dazu muss die Peakfläche mit einem Pigment und Detektorspezifischen Faktor multipliziert werden. Zur Berechnung der Faktoren wurden die Referenzpigmente  $\beta$ -Carotin, Lutein, Canthaxanthin und Astaxanthin bekannter Konzentration in die HPLC injiziert. Mittels der so erhaltenen Flächen wurden unter Zuhilfenahme der spezifischen Extinktionskoeffizienten  $\alpha$  ( $1 \text{ g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) dieser Pigmente die Detektorspezifische Konstante ermittelt. Sie lag für das verwendete Gerät bei 4560 Area/ $(\mu\text{g} \cdot \alpha)$  bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min, bzw. bei 3508 Area/ $(\mu\text{g} \cdot \alpha)$  für einen Fluss von 1,3 ml/min. Mittels der Detektorspezifischen Konstante und spezifischen Extinktionskoeffizienten aus der Literatur war es möglich, die Faktoren zur Umrechnung der Flächen bei spezifischen Wellenlängen in Pigmentmengen zu berechnen. Die verwendeten Faktoren sowie die Literaturquellen für die Extinktionskoeffizienten sind im Anhang (A.5, Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten) aufgeführt. Für 4-Ketolutein und 4-Ketorubixantin konnte keine Quelle für den spezifischen Extinktionskoeffizienten ausfindig gemacht werden. Für unbekannte Carotinoide soll ein spezifischer Extinktionskoeffizient von  $2500 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  angenommen werden (Britton et al., 1995). Der Wert für 4-Ketolutein ergab im Vergleich zu den anderen hier aufgeführten Ketocarotinoiden einen zu hohen molaren Extinktionskoeffizienten. Daher wurde als molarer Extinktionskoeffizient der Wert 2100

gewählt, so dass sich der molare Extinktionskoeffizient von 4-Ketolutein dem seines Konstitutionsisomers Adonixanthin annähert. Die molaren Extinktionskoeffizienten sind erwartungsgemäß für Pigmente mit gleichem Chromophor identisch. In der Literatur ist das nicht immer der Fall. Dies könnte an experimentellen Fehlern beim handhaben geringer Mengen liegen. So erklärt sich, warum sich in der Tabelle im Anhang unterschiedliche Flächenverhältnisse für Pigmente mit gleichem Chromophor errechneten (z.B.  $\alpha$ -Carotin und Lutein). Auf Grund der fehlenden Literaturdaten, jedoch vergleichbarer Chromophoren, wurden die molaren Extinktionskoeffizienten von Zeinoxanthin mit dem von Lutein gleichgesetzt und die von 4-Keto- $\alpha$ -Carotin und 4-Ketozeinoxanthin dem von 4-Ketolutein. Die Chromatogramme wurden bei Wellenlängen von 440, 473 oder 480 nm quantitativ ausgewertet.

### **2.6. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.6.1. PCR-Methoden**

##### **Primerdesign**

Das Primerdesign erfolgte mit den Programmen Bioedit, FastPCR und Primer3. Die Schmelztemperaturen wurden zwischen 55 °C und 65 °C gewählt. Die Position in den Vektoren wurde mit dem Programm pDRAW überprüft. Für Klonierungen in den pBAD-TOPO Expressionsvektor, der eine TA-Klonierungsstelle trägt, wurden die Primer-Sequenzen so gewählt, dass sie in Frame begannen.

##### **Präparative PCR-Ansätze**

Auf Grund der GC-reichen Templates wurde für präparative PCR-Ansätze das GC-Rich-Kit der Firma Roche als Basis verwendet. Die PCR-Reaktionen erfolgten grundsätzlich als Gradienten-PCRs mit einem Hotstart. Die Annealing-Temperatur für die PCR-Reaktion entsprach der Schmelztemperatur der an das Template bindenden Primersequenz. Die zwei weiteren Temperaturen ergaben sich, indem die Schmelztemperatur um vier Grad erhöht, bzw. erniedrigt wurde. Details zum Reaktionsansatz und zum PCR-Programm sind nachfolgend aufgeführt.

- Template	2	μL
- Primer 1	3,5	μL
- Primer 2	3,5	μL
- GC resolution solution	5	μL
- Nucleotide Mix (2,5mM)	4	μL
- H <sub>2</sub> O	17	μL
	35	μL
- GC-RICH buffer	10	μL
- H <sub>2</sub> O	4	μL
- GC-RICH DNA Pol.	1	μL
	15	μL

PCR-Programm:	T [°C]	t [s]		
Step 1:	95	Pause	(hot start)	
Step 2:	95	180		
Step 3:	95	30	x 10	-0,5 °C / cycle
Step 4:	58/62/66	30		
Step 5:	68	150		
Step 6:	95	30		
Step 7:	53/57/61	30	x 25	+ 5 s / cycle
Step 8:	68	150		
Step 9:	68	420		
Step 10:	4	Pause		

### Nested PCR

Für die Amplifikation von Genen aus cDNA wurde immer eine Nested PCR verwendet.

Als Basis für den Reaktionsansatz wurde das GC-Rich-Kit der Firma Roche verwendet. Der Reaktionsansatz entspricht der vorhergehend aufgeführten Präparativen PCR.

Der erste Teil der PCR-Reaktion, für die weiter außen liegenden Primer, ist nachfolgend aufgeführt. Die Annealing-Temperatur für die PCR-Reaktion wurde so gewählt, das die höhere Temperatur der Schmelztemperatur der an das Template bindenden Primersequenz, abzüglich von 2 °C entsprach. Die zweite Temperatur ergab sich, indem die vorher gewählte Temperatur um weitere vier Grad erniedrigt wurde.

PCR-Programm:	T [°C]	t [s]	
Step 1:	95	Pause	(hot start)
Step 2:	95	180	
Step 3:	95	30	x 18
Step 4:	53/57	30	
Step 5:	68	150	
Step 6:	68	420	+ 5 s / cycle
Step 7:	4	Pause	

Der Reaktionsansatz für den zweiten Teil der Reaktion entsprach ebenfalls dem der präparativen PCR. Als Template wurde das Produkt der ersten Reaktion vereint und eingesetzt. Details zum PCR-Programm für den zweiten Teil mit den weiter innen liegenden Primern sind nachfolgend aufgeführt. Die Annealing-Temperatur für die PCR-Reaktion wurde so gewählt, dass die mittlere Temperatur der Schmelztemperatur der Primersequenz entsprach, die an das Template bindet. Die zwei weiteren Temperaturen ergaben sich indem die Schmelztemperatur um vier Grad erhöht, bzw. erniedrigt wurde.

PCR-Programm:	T [°C]	t [s]	
Step 1:	95	Pause	(hot start)
Step 2:	95	180	
Step 3:	95	30	x 10
Step 4:	58/62/66	30	
Step 5:	68	150	
Step 6:	95	30	x 16
Step 7:	53/57/61	30	
Step 8:	68	150	+ 5 s / cycle
Step 9:	68	420	
Step 10:	4	Pause	

### Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde standardmäßig als Methode zur Überprüfung der Klonierungsprodukte angewendet. Als Basis für die Kolonie-PCR wurde das KAPA2G Robust PCR Kit von Peqlab (Erlangen) genutzt. Die Primerkombination wurde so gewählt, dass das PCR-Produkt zwischen 150 und 500 bp Länge aufwies. Die Kolonien wurden mit sterilen Spitzen gepickt und unmittelbar in den fertigen PCR-Ansatz eingebracht. Details zum Reaktionsansatz und zum PCR-Programm sind nachfolgend aufgeführt.



	Kolonie
- Template	
- Primer 1	4 $\mu\text{L}$
- Primer 2	4 $\mu\text{L}$
- KAPA Buffer A	5 $\mu\text{L}$
- KAPA Enhancer 1	5 $\mu\text{L}$
- MgCl 25mM	1 $\mu\text{L}$
- Nucleotide Mix (10mM)	0,5 $\mu\text{L}$
- H <sub>2</sub> O	5,45 $\mu\text{L}$
- KAPA2G Robust Pol.	0,05 $\mu\text{L}$
	25 $\mu\text{L}$

PCR-Programm:	T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	t [s]		
Step 1:	95	300		
Step 2:	95	30	x 30	-0,3 $^{\circ}\text{C}$ / cycle
Step 3:	57	30		
Step 4:	72	45		
Step 5:	72	60		
Step 6:	4	Pause		

### 2.6.2. Aufreinigungen von DNA-Proben

Die Aufreinigung von DNA-Proben erfolgte mit dem E.Z.N.A.Cycle-Pure Kit von Peqlab (Erlangen) nach Angaben des Herstellers.

### 2.6.3. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll von Werner 2011 und wurde auf der Basis des High Pure RNA Isolation Kit (Roche) durchgeführt. Das Zellmaterial wurde zunächst in 10 mM TRISLösung (pH 8,0) und dem im Kit enthaltenen Lysispuffer aufgenommen und mittels Beadbeater aufgeschlossen. Zum Aufschluss wurden die Precellys-Gas/Keramik-Kit SK38 von Peqlab (Erlangen) verwendet. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach Herstellerangaben.

### 2.6.4. Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mit dem High Fidelity cDNA-System (Roche). Die Reaktion wurde bei 53  $^{\circ}\text{C}$ , mit dem maximalen Volumen an RNA und Oligo-dT-Primern nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.6.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäureproben erfolgte im Biophotometer (Eppendorf) nach Angaben des Herstellers oder mittels Gelelektrophorese (Sambrook and Russell, 2001).

### **2.6.6. A-Addition**

Die A-Addition erfolgte nach Sambrook and Russell (2001) mit der TAQ-DNA-Polymerase, 10x Puffer und dATPs von Fermentas.

### **2.6.7. Klonierung**

Die Klonierungsreaktionen erfolgten mit dem Rapid DNA Ligation, Fermentas nach Angaben des Herstellers.

### 2.6.8. Agarose-Gelelektrophorese

<b>Horizontale Gele</b>	
Gel:	1%iges Agarosegel in 1xTAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA; pH 8,5)
Gelkammer:	Gelkammern von Peqlab in verschiedenen Formaten
Laufpuffer:	1xTAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA; pH 8,5)
Spannung:	180 V
Laufzeit:	20 min
Aufgetragene Mengen:	1-15 µl DNA + Loading Dye (6x Loading Dye, R0611, Fermentas) 6 µl Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder bzw Gene Ruler™ DNA Ladder Mix

Anschließend wurden die Gele unter Schütteln im Ethidiumbromid-Färbebad (1µg EtBr/ml dH<sub>2</sub>O) für 10 Minuten gefärbt und 3 Minuten in dH<sub>2</sub>O entfärbt. Die Dokumentation wurde mit der Geldokumentationsanlage Gel Doc 1000 und der Software „Molecular Analyst“ (Bio-Rad, München) vorgenommen.

### 2.6.9. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit, C-Line, (Peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers.

### 2.6.10. Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers.

### 2.6.11. Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung wurde von der Firma Genterprise (Mainz) oder der Firma Starseq (Mainz) als sog. Homerun durchgeführt. Die DNA wurde dabei nach den Vorgaben der Unternehmen mit Primern versetzt.

## 2.7. Datenbanken und Bioinformatikprogramme

### Lokal installierte Software

<b>Name</b>	<b>Web-Link</b>
Bioedit (Version 7.0.8)	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a>
FastPCR: (Version 4.0.27)	<a href="http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm">http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm</a>
pDraw32 (Version 1.1.110)	<a href="http://www.acaclone.com/">http://www.acaclone.com/</a>

### Webbasierte Datenbanken/Software

<b>Name</b>	<b>Web-Link</b>
BLAST-Suche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
MegaBLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace.shtml">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace.shtml</a>
<i>Chlamydomonas</i> Center	<a href="http://www.chlamy.org/">http://www.chlamy.org/</a>
Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3/">http://frodo.wi.mit.edu/primer3/</a>
ChloroP	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/</a>

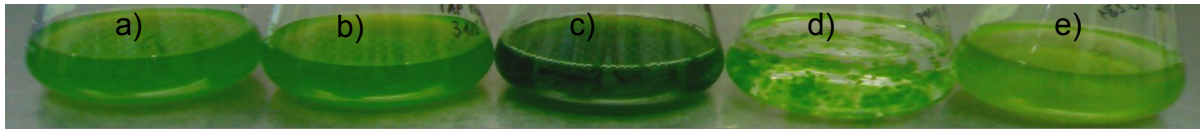
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Identifizierung und Quantifizierung von Ketocarotinoiden und die Verbreitung der Fähigkeit zur Akkumulation von 4-Ketolutein in Dauerstadien der Grünalgen

Von einer Reihe Grünalgen ist bekannt, dass sie unter ungünstigen Umweltbedingungen Dauerstadien bilden und Ketocarotinoide akkumulieren (Czygan, 1968; Goodwin, 1980; Sun et al., 2010). Unter Laborbedingungen kann das vor allem durch Stickstoffmangel simuliert werden. Die Analyse der Carotinoidzusammensetzung verschiedener Grünalgen wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erneut durchgeführt, da Untersuchungen von vorausgegangenen Experimenten die Vermutung nahe legten, dass dabei eine wichtige Klasse von Pigmenten übersehen wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, dass diese Pigmentklasse unter den Grünalgen weit verbreitet ist, wobei der hier gemessene hohe Anteil dieser Spezies am Gesamtpigmentgehalt die physiologische Bedeutung unterstreicht, die diese Pigmente für die Organismen haben müssen. Erste Tests dazu wurden innerhalb der Arbeitsgruppe von Schmidt (2007) und Bauch (2007) für *C. reinhardtii*, Bauch (2007) für *H. pluvialis* und von Köhler (2008) für *M. zofingiensis*, *S. rubescens* und *F. tuberosa* unternommen. Durch die vorliegende Arbeit sollten weitere Pigmente identifiziert werden und durch verschiedene biochemische Analysen eine Übersicht der Zusammensetzung der Ketocarotinoidspezies erstellt und die bisher vorläufigen Pigmentidentifizierungen auf eine breitere experimentelle Grundlage gestellt werden.

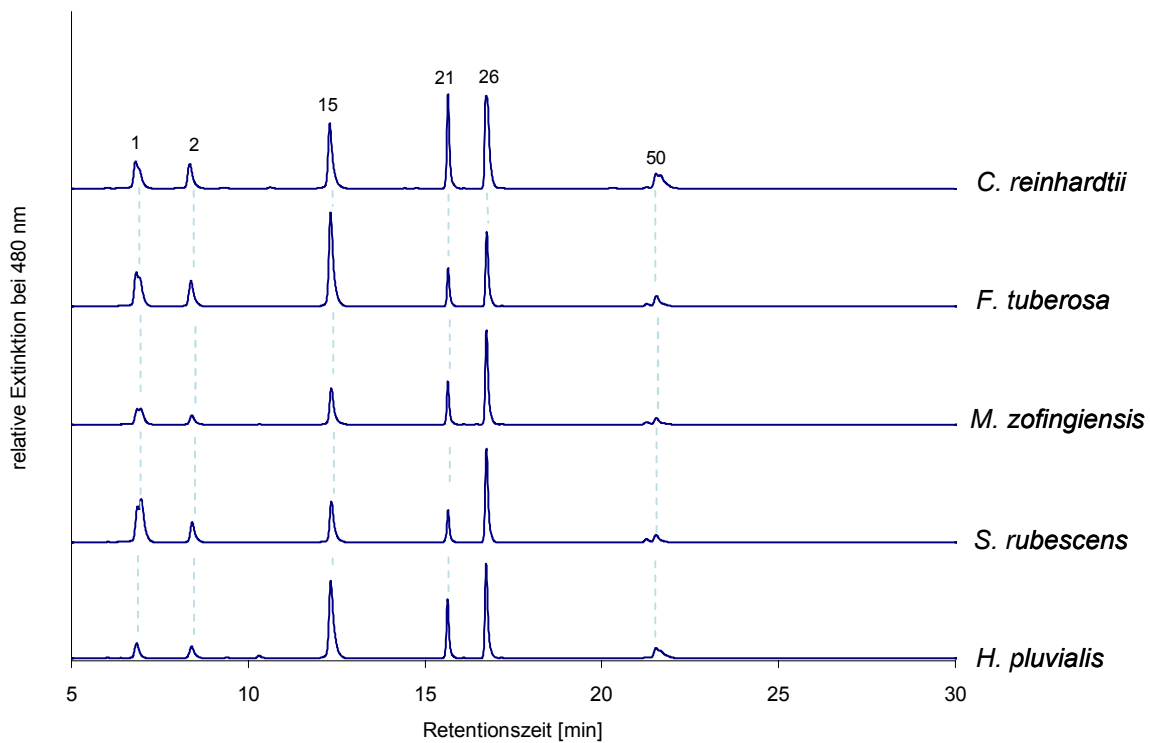
##### 3.1.1. Analyse der Pigmentzusammensetzung von Grünalgenvertretern in der exponentiellen Wachstumsphase.

In der Abb. 3 sind Ansätze von Flüssigkulturen der Organismen *M. zofingiensis* SAG 38-40, *M. zofingiensis* SAG 211-14, *F. tuberosa* SAG 112-80, *S. rubescens* SAG 5-95 und *H. pluvialis* SAG 192-80 im vegetativen Stadium abgebildet. Die grüne Farbgebung der Kulturen ist der Dominanz der grünen Chlorophylle gegenüber den gelb-orangen Primärcarotinoiden zuzuschreiben.



**Abb. 3** Vegetative Kulturen verschiedener Grünalgen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase, 6 Tage alt. a) *M. zofingiensis* SAG 38-40, b) *M. zofingiensis* SAG 211-14, c) *F. tuberosa* SAG 112-80, d) *S. rubescens* SAG 5-95, e) *H. pluvialis* SAG 192-80.

In den Pigmentextrakten der vegetativen Zellstadien im exponentiellen Wachstum war in der HPLC-Analyse mit Methode 2 die typische Pigmentzusammensetzung von Grünalgen zu beobachten (Abb. 4): Chlorophyll a (26) und Chlorophyll b (21), sowie die dominierenden Primärcarotinoide Neoxanthin (1), Violaxanthin (2), Lutein (15) und  $\beta$ -Carotin (50).

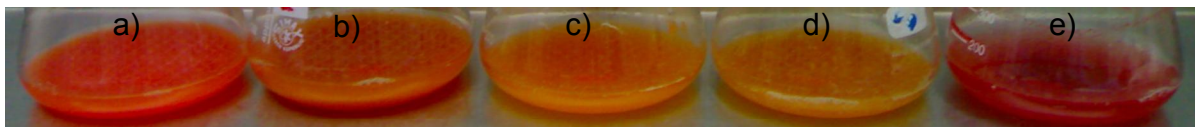


**Abb. 4** HPLC-Analyse von Pigmentextrakten ausgewählter vegetativer Grünalgenkulturen in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 2 erstellt und zeigten die typische Pigmentzusammensetzung der Grünalgen mit 9-cis-Neoxanthin (1), Violaxanthin (2), Lutein (15), Chl b (21), Chl a (26) und  $\beta$ -Carotin (50). Bei den Kulturen handelte es sich um: *C. reinhardtii* cc620, *F. tuberosa* SAG 112-80, *M. zofingiensis* SAG 38-40, *S. rubescens* SAG 5-95 und *H. pluvialis* SAG 192-80.

### 3.1.2. Analyse der Pigmentzusammensetzung von Dauerstadien ausgewählter Grünalgenvertreter

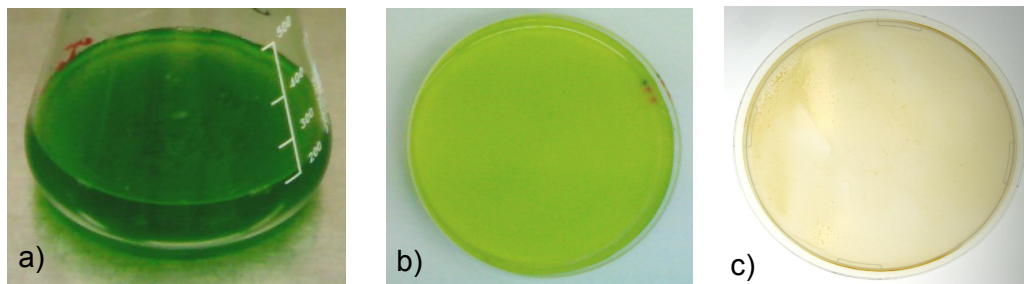
### 3.1.2.1. Bildung der Dauerstadien

Zu Beginn wurden die vorhergehend beschriebenen vegetativen Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase in ein stickstofffreies Flüssigmedium überführt, wodurch die Algen innerhalb mehrerer Wochen ein als Aplanosporen bezeichnetes Dauerstadium mit einem orange bis rötlichem Erscheinungsbild ausbildeten.



**Abb. 5** Dauerstadien der Grünalgen aus Abb. 3 nach 3-monatiger Inkubation in Kulturmedium ohne Stickstoffquelle a) *M. zofingiensis* SAG 38-40, b) *M. zofingiensis* SAG 211-14, c) *F. tuberosa* SAG 112-80, d) *S. rubescens* SAG 5-95, e) *H. pluvialis* SAG 192-80.

Kulturen des Modellorganismus *C. reinhardtii* konnten nicht durch eine Verknappung des Nahrungsangebots in ein vergleichbares Stadium überführt werden, aber nach der Paarung der Wildtypstämme cc620 und cc621 wiesen die Zygosporen nach einer mehrwöchigen Lagerungszeit im Dunkeln ebenfalls eine gelb-orange Farbe auf (Abb. 6).



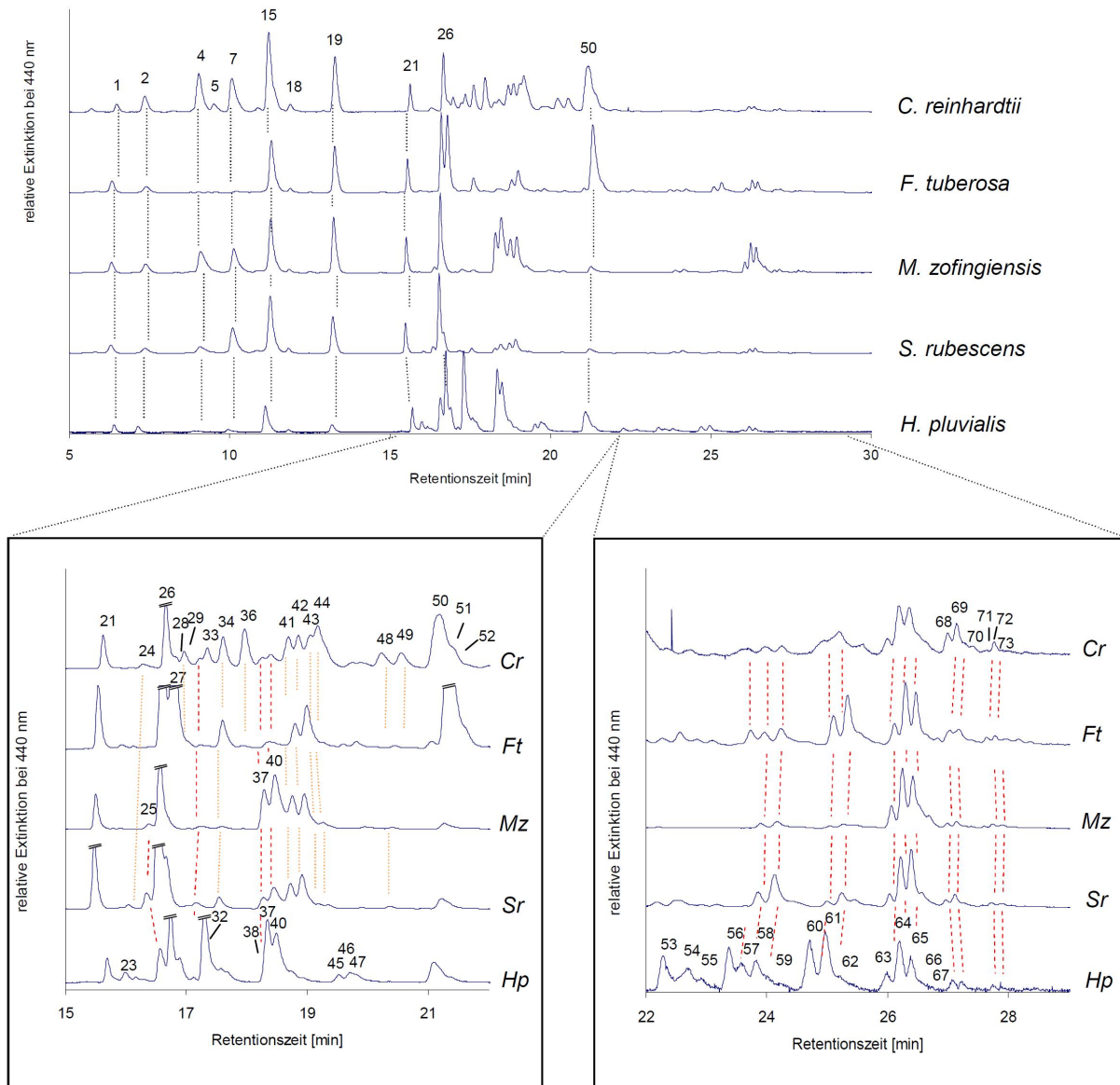
**Abb. 6** a) *Chlamydomonas reinhardtii* Kultur cc620 im exponentiellen Wachstum, b) *Chlamydomonas reinhardtii* cc620 x cc621 Paarungsansatz zum Zeitpunkt der Vereinigung und c) 3 Monate alte Zygoten von *C. reinhardtii* cc620 x cc621.

### 3.1.2.2. Die HPLC-Analyse der Pigmentzusammensetzung in der Übersicht

Die vorhergehend beschriebenen orangen bis roten Aplanosporen werden im Folgenden zusammen mit den orangen Zygosporen von *C. reinhardtii* unter dem Begriff Dauerstadien zusammengefasst.

In den HPLC-Chromatogrammen der Dauerstadien (Abb. 7) wurde eine große Anzahl neuer Pigmentpeaks gegenüber den Pigmentextrakten der vegetativen Zellen beobachtet. Hier zu nennen sind die Peaks 4, 7 und 19, sowie mehr als 30 neue Peaks mit einer Retentionszeit zwischen 16 und 28 Minuten. Auffällig war, dass die untersuchten Algen basierend auf den Retentionszeiten sehr ähnliche Pigmentmuster aufwiesen. Auch die UV/VIS Spektren bestätigten dies. Peaks mit vergleichbarer Retentionszeit und vergleichbarem Spektrum in den verschiedenen Organismen wurden in eine Kategorie eingeordnet. In den Chromatogrammen der Abb. 7 ist das mit gepunkteten bzw. gestrichelten Linien angedeutet. Anschließend wurde jedem Pigment eine eindeutige Nummer zugeordnet. Die Identität der Pigmente kann anhand dieser Nummern in der vorliegenden Arbeit verfolgt werden. Eine Übersicht über sämtliche Pigmente der vorliegenden Arbeit gibt die Tabelle 1.





**Abb. 7** HPLC-Analyse von Pigmentextrakten ausgewählter Grünalgen-Dauerkulturen. Pigmente mit identischer Retentionszeit und identischen Spektren sind in den Chromatogrammen mittels gestrichelter Linien verbunden. Die rot gestrichelten Linien in der Detailansicht gekennzeichnete Pigmente wiesen im UV/VIS-Bereich ein Astaxanthin-Spektrum auf. Die durch orange gepunktete Linien verbundenen Pigmentpeaks wiesen ein 4-Ketolutein-Spektrum auf. Eine detaillierte Zuordnung der Pigmentnamen zu den Nummern aus der Abb. 7 kann der Tabelle 1 entnommen werden. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 2 erstellt. Bei der Alge *M. zofingiensis* in der Abb. 7 handelt es sich um den Stamm SAG 38-40.

## ERGEBNISSE

**Tabelle 1** Auflistung der Pigmente aus den HPLC-Chromatogrammen. Jedem Pigment wurde eine Nummer zugeordnet. Über diese Nummer kann die Identität der Pigmente aus den Chromatogrammen in der vorliegenden Arbeit verglichen werden.

Peak-Nr.	Bezeichnung	HPLC-Methode	Spektrum + Retentionszeit	MS	Referenzpigment	Isomerisierung	Enzymtests	Verseifung	Reduktion
1	Neoxanthin	2	x						
2	Violaxanthin	2	x						
3	Violaxanthin, externer Standard	2	x						
4	Astaxanthin	2, 3	x	x	x	x	x		x
5	Antheraxanthin	2	x						
6	cis-Astaxanthin 1	2	x			x			
7a	4-Ketoluteinderivat	2	x						
7	4-Ketolutein	2	x	x		x	x		x
8	Adonixanthin	2	x				x		
9	cis-Astaxanthin 2	2	x			x			
10	cis-4-Ketolutein 1	2	x			x			
11	cis-4-Ketolutein 2	2	x			x			
12	Adonirubin 1	2	x				x		x
13	Adonirubin 2	2	x				x		x
14	cis-Adonirubin	2	x						
15a	Luteinderivat	2	x						
15	Lutein	2	x	x	x				
16	Zeaxanthin	2	x		x		x		
17	unbekannt	2							
17a	cis-Zeaxanthin	2	x				x		
18	cis-Lutein	2	x				x		
19	Canthaxanthin	2	x	x	x	x	x		x
20	unbekannt	2							
20a	4-Ketorubixanthin	2	x				x		
20b	Rubixanthin	2	x		x		x		
20c	4-Ketozeinoxanthin	2	x				x		
20d	Zeinoxanthin	2	x				x		
20e	4-Keto- $\alpha$ -Carotin	2	x				x		
21	Chlorophyll b	2	x		x				
22	Astaxanthin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
23	4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
24	4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
25	Astaxanthin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
26	Chlorophyll a	2	x		x				
27a	cis-Echinenon	2							
27	Echinenon	2	x	x			x		x
28	4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
29	4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
30	Adonirubin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
31	Adonirubin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
32	cis-Astaxanthin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
32b	Astaxanthin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
33	nicht identifizierbar	2							
34	4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
35	cis-4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
36	4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
37	Astaxanthin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
38	Adonirubin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
39	cis-Adonirubin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
40	Astaxanthin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
41	4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
42	4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
43	cis-4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
44	cis-4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
45	Adonirubin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
46	Adonirubin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
47	Astaxanthin-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
48	4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
49	4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x	
49a	Lycopin	2	x				x		
49b	$\delta$ -Carotin	2	x				x		
49c	$\alpha$ -Carotin	2	x		x		x		
49d	$\gamma$ -Carotin	2							
50	$\beta$ -Carotin	2	x	x	x		x		

51	9- <i>cis</i> - $\beta$ -Carotin	2	x		x		x	
52	4-Ketolutein-Fettsäure-Monoester	2	x					x
52b	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
53	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
54	nicht identifizierbar	2	x					x
55	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
56	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
57	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
58	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
59	<i>cis</i> -Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
60	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
61	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
62	<i>cis</i> -Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
63	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
64	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
65	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
66	<i>cis</i> -Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
67	<i>cis</i> -Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
68	<i>cis</i> -Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
69	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2						
70	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
71	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
72	<i>cis</i> -Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
73	Astaxanthin-Fettsäure-Diester	2	x					x
74	<i>cis</i> -4-Ketolutein	2	x			x		
75	<i>cis</i> -4-Ketolutein	2	x			x		
76	13- <i>cis</i> -4-Ketolutein	3	x			x		
77	13'- <i>cis</i> -4-Ketolutein	3	x			x		
78	9- <i>cis</i> -4-Ketolutein	3	x			x		
79	9'- <i>cis</i> -4-Ketolutein	3	x			x		
80	Crustaxanthin	3	x					x
81	Crustaxanthin	3	x					x
81a	Crustaxanthin	3	x					x
82	<i>cis</i> -Crustaxanthin	3	x					x
83	4-Hydroxylutein	3	x					x
84	4-Hydroxylutein	3	x					x
84a	4-Hydroxylutein	3	x					x
85	4-Hydroxyzeaxanthin	3	x					x
85a	4-Hydroxyzeaxanthin	3	x					x
85b	4-Hydroxyzeaxanthin	3	x					x
86	Isozeaxanthin	3	x					x
87	nicht identifizierbar	3						
88	nicht identifizierbar	3						
89	nicht identifizierbar	3						
90	4-Hydroxy- $\beta$ -carotin	3	x					x
91	13- <i>cis</i> -4-Hydroxylutein	3	x					x
92	13'- <i>cis</i> -4-Hydroxylutein	3	x					x
93	all- <i>trans</i> -4-Hydroxylutein	3	x					x
94	all- <i>trans</i> -4-Hydroxylutein	3	x					x
95	9- <i>cis</i> -4-Hydroxylutein	3	x					x
96	9'- <i>cis</i> -4-Hydroxylutein	3	x					x
100	<i>cis</i> -Astaxanthin	3	x		x		x	
101	<i>cis</i> -Astaxanthin	3	x		x		x	
102	<i>cis</i> -Astaxanthin	3	x		x		x	
103	<i>cis</i> -Astaxanthin	3	x		x		x	
104	13- <i>cis</i> -Astaxanthin	3	x		x		x	
105	9- <i>cis</i> -Astaxanthin	3	x		x		x	
201	all- <i>trans</i> -4-Ketoluteinderivat	3	x					
202	<i>cis</i> -Astaxanthin	3	x			x		
203	nicht identifizierbar	3						
204	all- <i>trans</i> -Luteinderivat	3	x					
205	nicht identifizierbar	3						
206	all- <i>trans</i> -4-Ketolutein	3	x	x				x
207	all- <i>trans</i> -Astaxanthin	3	x	x	x			x
208	all- <i>trans</i> -Lutein	3	x	x	x			
209	Adonirubin	3	x				x	
210	Adonixanthin	3	x					
211	Canthaxanthin	3	x	x	x			x
212	Zeaxanthin	3	x		x			
213	4-Ketozeinoxanthin	3	x				x	
214	4-Keto- $\alpha$ -Carotin	3	x				x	
215	Zeinoxanthin	3	x				x	
216	$\alpha$ -Cryptoxanthin	3	x				x	

## ERGEBNISSE

216a	nicht identifizierbar	3								
217	Echinenon	3	x	x				x		x
217a	13- <i>cis</i> - $\alpha$ -Carotin	3	x				x			
218	13'- <i>cis</i> - $\alpha$ -Carotin	3	x				x			
219	all- <i>trans</i> - $\epsilon$ -Carotin	3	x					x		
220	13- <i>cis</i> - $\beta$ -Carotin	3	x				x			
221	all- <i>trans</i> - $\alpha$ -Carotin	3	x		x			x		
222	9- <i>cis</i> - $\alpha$ -Carotin	3	x				x			
223	<i>cis</i> - $\delta$ -Carotin	3	x					x		
224	9'- <i>cis</i> - $\alpha$ -Carotin	3	x				x			
225	all- <i>trans</i> - $\beta$ -Carotin	3	x	x	x			x		
226	<i>cis</i> - $\delta$ -Carotin	3	x					x		
227	9- <i>cis</i> - $\beta$ -Carotin	3	x				x			
228	<i>cis</i> - $\delta$ -Carotin	3	x					x		
229	all- <i>trans</i> -4-Hydroxyrubixanthin	3	x					x		
230	$\beta$ -Zeacarotin	3	x					x		
231	all- <i>trans</i> - $\delta$ -Carotin	3	x					x		
232	all- <i>trans</i> -Rubixanthin	3	x			x		x		
233	9- <i>cis</i> - $\delta$ -Carotin	3	x					x		
234	all- <i>trans</i> - $\gamma$ -Carotin	3	x					x		
235	13- <i>cis</i> -Lycopin	3	x					x		
236	9- <i>cis</i> -Lycopin	3	x					x		
237	all- <i>trans</i> -Lycopin	3	x		x			x		

Um die Pigmentzusammensetzung der komplexen Proben zu analysieren, wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt. Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht zu den Experimenten, die zum Nachweis der Pigmentzusammensetzung aus den verschiedenen Vertretern der Grünalgendauerkulturen durchgeführt wurden und in der Folge vorgestellt werden.

**Tabelle 2** Übersicht zu den Experimenten zur Analyse der Pigmentzusammensetzung in Dauerstadien verschiedener Grünalgenvertreter.

Organismus	Stamm	Vegetatives Stadium	Zygosporen / Dauerstadien	Zygosporen / Dauerstadien verseift	Zygosporen / Dauerstadien reduziert	Monoacyl ester fraktioniert	Monoacyl ester verseift	Monoacyl ester reduziert	Diacyl ester fraktioniert	Diacyl ester verseift	Diacyl ester reduziert
<i>C.reinhardtii</i>	cc620	x									
<i>C.reinhardtii</i>	cc621	x									
<i>C.reinhardtii</i>	cc620/cc621		x	x	x	x	x		x	x	
<i>Muriella zofingiensis</i>	SAG 34-80	x	x	x	x	x	x		x	x	
<i>Muriella zofingiensis</i>	SAG 211-14	x	x	x							
<i>Frittschiella tuberosa</i>	SAG 112-80	x	x	x		x	x	x	x	x	x
<i>Scenedesmus rubescens</i>	SAG 5-95	x	x	x	x	x	x		x	x	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	SAG 192-80	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

### **3.1.3. Identifizierung der freien Pigmente aus Grünalgen-Dauerstadien**

In den Dauerstadien wurden auch die Pigmente identifiziert, die bereits in den vegetativen Stadien vorkamen, nämlich die Pigmente Neoxanthin (1), Violaxanthin (2), Lutein (15), Chlorophyll b (21), Chlorophyll a (26) und  $\beta$ -Carotin (50). Diese konnten mittels UV/VIS-online-Spektrum in Verbindung mit der Retentionszeit bestimmt werden. Zudem lagen  $\beta$ -Carotin und Lutein als Referenzpigmente vor.

#### **3.1.3.1. Identifikation freier Ketocarotinoide**

Die freien Ketocarotinoide aus den Pigmentextrakten der Grünalgendauerstadien (Abb. 7) wiesen Retentionszeiten von 8-17 Minuten auf.

Peak 4 konnte mit einem Referenzpigment (BASF) eindeutig als Astaxanthin identifiziert werden, das Pigment 19 mittels Referenzpigment als Canthaxanthin (BASF). Die UV/VIS Spektren stimmten zusätzlich mit den Literaturdaten (Britton et al., 2004) überein.

Der Peak 27 konnte als Echinenon identifiziert werden. Neben dem UV/VIS Spektrum aus der Literatur (Britton et al., 2004) gründet diese Identifikation auf Bakterienversuchen mit der Ketolase (BKT) aus *C. reinhardtii*, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels heterologer Expression in *E. coli* untersucht wurde. Bei der Ketolierung von  $\beta$ -Carotin zu Canthaxanthin entsand als Intermediat das Monoketolierungsprodukt Echinenon (siehe Kapitel 3.3.2.1 und Anhang, A.8). Zusätzlich wird diese Zuordnung durch Reduktionsexperimente mittels  $\text{NaBH}_4$  gestützt. In den Experimenten zur Reduktion von *F. tuberosa*-Extrakten, Abb. 24, Peak 90 wurde der bezogen auf die Fläche zweitgrößte Pigmentpeak (Echinenon, 27) reduziert und fand sich als zweitgrößter Flächenpeak (4-Hydroxy- $\beta$ -carotin, 90) mit leicht verkürzter Retentionszeit und einem dem  $\beta$ -Carotin entsprechenden Spektrum wieder. Der Flächenvergleich ist möglich, da die Pigmente einen ähnlichen molekularen Extinktionskoeffizienten aufweisen (siehe Anhang, A.5).

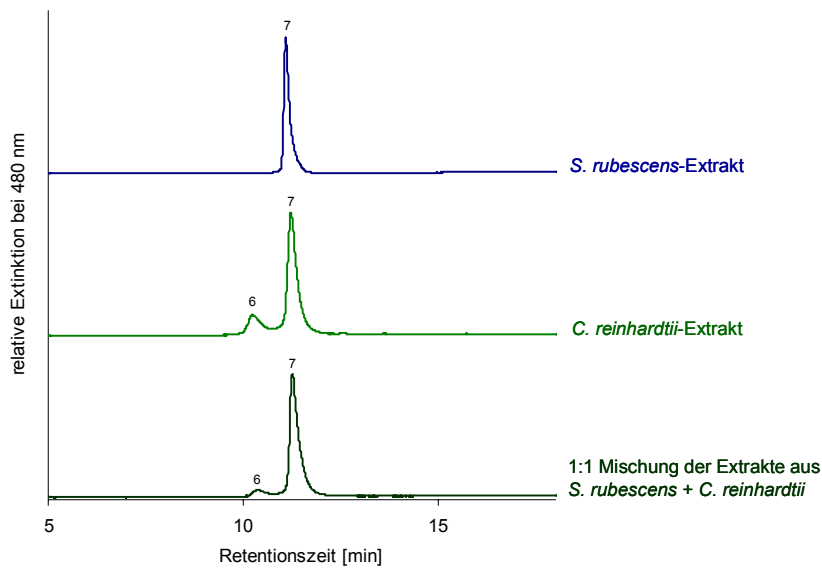
#### **3.1.3.2. Identifizierung von 4-Ketolutein in Dauerstadien von Grünalgen.**

Zum Peak 7 (Abb. 7) war kein Pigmentstandard kommerziell erhältlich. Schmidt (2007) konnte auf dem auch für diese Arbeit verwendeten Chromatographiesystem nachweisen, dass es sich bei dem Peak 7 aus *C. reinhardtii* um 4-Ketolutein handelt. Die Pigmentidentität wurde in seiner Arbeit durch MS verifiziert.

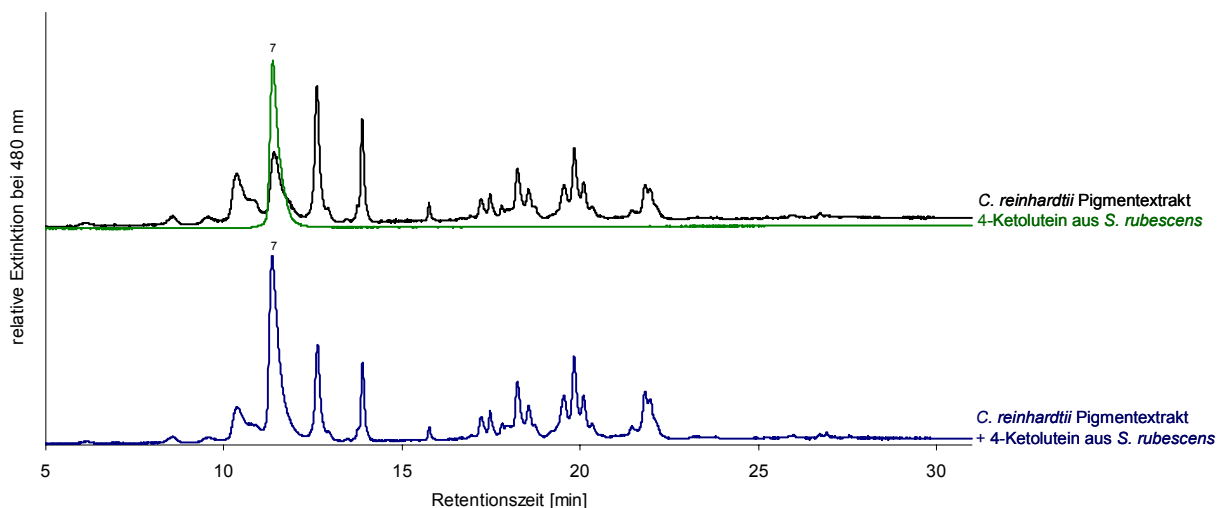
Durch den Vergleich der Retentionszeiten und der UV/VIS-Spektren konnte bei den hier vorliegenden Analysen 4-Ketolutein identifiziert werden. Zusätzlich wurde die Identifikation durch selektive Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  gestützt, bei der die Ketogruppe des 4-Ketoluteins an der Position 4 im  $\beta$ -Iononring zur Hydroxygruppe reduziert wurde, wodurch das reduzierte Pigment ein Luteinspektrum aufwies (Abb. 17).

### Die Präparation von 4-Ketolutein

Der Übersicht der Chromatogramme in Abb. 7 ist zu entnehmen, dass nicht nur *C. reinhardtii*, sondern auch weitere Algen den Pigmentpeak Nummer 7 bei gleicher Retentionszeit aufwiesen. Auch das UV/VIS Spektrum aller dieser Pigmente war mit dem charakteristischen 4-Ketolutein-Pigmentspektrum identisch (Abb. 15). Um die Anwesenheit von 4-Ketolutein in den Algen weiter abzusichern, wurden aus drei Monate alten Dauerkulturen von *S. rubescens* die Pigmente isoliert (Kapitel 2.4.2). Diese wurden anschließend unter Sauerstoffausschluss bei milden basischen Bedingungen verseift, um den Anteil an freiem 4-Ketolutein zu erhöhen (Kapitel 2.4.4). Der Peak Nr. 7 wurde während des HPLC-Laufs abgefangen. Das so erhaltene 4-Ketolutein wurde zur Bestätigung seiner Reinheit mit der HPLC-Methode 3 auf der  $\text{C}_{30}$ -Säule, sowie mit der HPLC-Methode 2 auf der  $\text{C}_{18}$ -Säule analysiert (Abb. 8). 4-Ketolutein aus *S. rubescens* wurde außerdem mit 4-Ketoluteinextrakt von *C. reinhardtii* gemischt und in der HPLC analysiert (Abb. 9). Es ergab sich ein einziger Peak, der die Identität der beiden Pigmente verdeutlicht. Die Verdünnung des *C. reinhardtii*-Extrakts durch Mischen mit dem *S. rubescens*-Extrakt kann an der Verunreinigung der *C. reinhardtii*-Probe mit *cis*-Astaxanthin (Peak 6, Abb. 8) beobachtet werden, der bei der *S. rubescens*-Probe nicht vorhanden ist. Die Flächenverhältnisse zwischen Peak 7 und Peak 6 in Abb. 8 verändern sich durch die Verdünnung zugunsten des Peaks 7.



**Abb. 8** HPLC-Chromatogramme von präpariertem 4-Ketolutein (7). Aus den Pigmentextrakten der Aplanosporen von *S. rubescens* und der Zygoten von *C. reinhardtii* (vergleiche Abb. 7) wurden während der Analyse mittels HPLC-Methode 2 die Pigmente des Peaks 7 abgefangen, nachdem sie den Detektor passiert hatten. Die UV/VIS-Spektren des Peaks 7 aus den beiden Algen waren identisch. In der Abb. 8 ist der HPLC-Lauf dieser Fraktionen einzeln und als Gemisch dargestellt. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 2 erstellt.

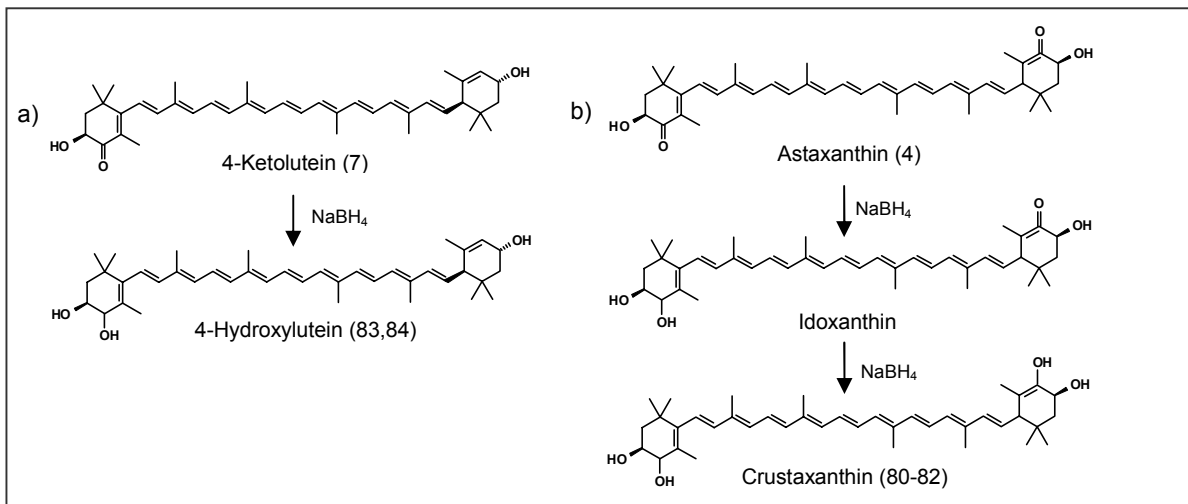


**Abb. 9** HPLC-Lauf von abgefangenem Pigment Nummer 7 aus Aplanosporen von *S. rubescens* (grün) im Vergleich mit einer HPLC-Analyse des Pigmentextrakts aus reifen Zygosporen von *C. reinhardtii* (schwarz). In Blau dargestellt ist das Chromatogramm eines Gemischs aus den zuvor genannten Proben. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 2 erstellt.

**Die chemische Reduktion von 4-Ketolutein mit NaBH<sub>4</sub>**

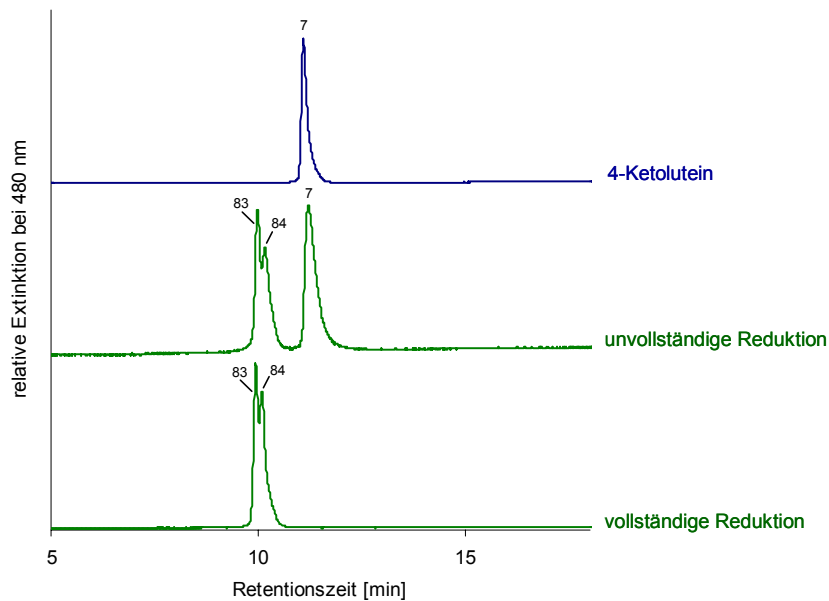
Als weiterer Nachweis für die Identität von 4-Ketolutein wurde das Pigment 7 aus der Extraktion von *S. rubescens* einer Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> unterzogen. Bei der Reaktion wurden selektiv die Ketogruppen in der Probe durch das NaBH<sub>4</sub> zur Hydroxygruppe reduziert. An der Position 4 des β-Iononrings von 4-Ketolutein entstand durch die Reaktion aus der Ketogruppe eine Hydroxygruppe. Die unvollständige Reaktion zeigte keinen Intermediatpeak. Bei vollständiger Reduktion ergab sich ein Doppelpeak (83, 84, siehe Abb. 11). Das UV/VIS Spektrum der beiden Pigmente 83 und 84 war identisch mit dem von Lutein. Die unvollständige Reduktion des Pigments im Vergleich zur vollständigen Reduktion bestätigte, dass kein Zwischenproduktpeak vorhanden war. Daraus lässt sich schließen, dass das Pigment nur eine Ketogruppe tragen kann. Bei zwei Ketogruppen wie z. B. bei der Reduktion von Astaxanthin würde man bei der unvollständigen Reduktion mindestens einen weiteren Peak, bzw. Doppelpeak für ein Zwischenprodukt erhalten (Werner, 2011). Da die Reaktion nicht stereospezifisch abläuft, ergibt sich ein Gemisch aus Enantiomeren, was den entstehenden Doppelpeak 83 und 84 (Abb. 11) erklärt. Es handelte sich damit bei den Pigmenten 83 und 84 um 4-Hydroxylutein (Abb. 10), welches das gleiche Chromophor und damit das gleiche Spektrum aufweist wie Lutein.

Für die Pigmente Astaxanthin und Canthaxanthin hat Werner (2011) die entsprechenden Reduktionsversuche mit der gleichen Methode durchgeführt.



**Abb. 10** Vergleich der Reaktionsprodukte von 4-Ketolutein und Astaxanthin bei selektiver Reduktion mit Natriumborhydrid. Die entstehende OH-Gruppe an Position 4 ist bei beiden Pigmenten nicht stereospezifisch, sondern ein Gemisch aus R und S-Konfiguration. Darüber hinaus verändert sich das Chromophor durch die Reduktion. Während die Ketogruppe sich in Konjugation mit dem π-Elektronensystem befindet, ist das nach der Reduktion in der resultierenden OH-Gruppe an Position 4 nicht mehr der Fall.

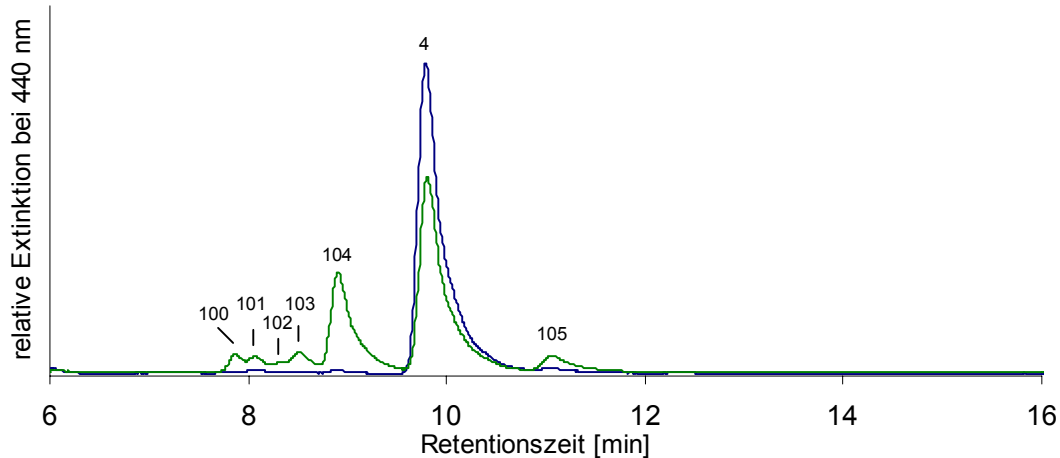




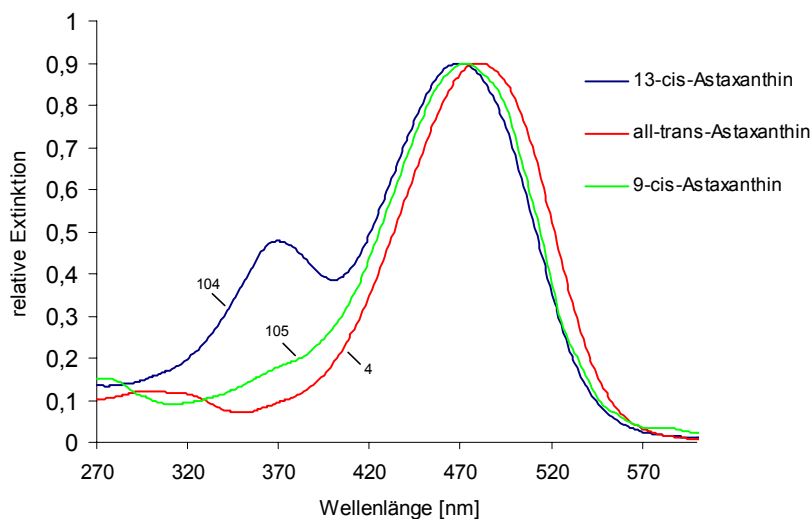
**Abb. 11** Nachweis der Identität von Pigment Nummer 7 als 4-Ketolutein durch selektive Reduktion der Ketogruppe mit  $\text{NaBH}_4$ . Aufgeführt sind die mit der HPLC-Methode 2 erstellten Chromatogramme, von Proben vor der Reduktion, bei vorzeitig abgestoppter Reduktionsreaktion und nach vollständiger Reduktion. Die neuen Pigmente 83 und 84 wiesen im online-UV/VIS-Spektrum ein dem Lutein äquivalentes Spektrum auf.

### 3.1.3.3. Erstellung einer Spektrenbibliothek von *cis*-Isomeren des Astaxanthins

Um die *cis*-Spezies von Astaxanthin in den Pigmentproben der Algen identifizieren zu können, wurde zunächst eine Referenzbibliothek von *cis*-Isomeren dieses Pigments erstellt. Dazu wurde synthetisches all-*trans*-Astaxanthin in Dichlormethan / Methanol (1:5) gelöst und im geschlossenen Gefäß für 10 Minuten bei 100 °C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch mittels HPLC analysiert (Abb. 12). Die Peaks Nr. 104 und 105 wurden anhand ihrer Absorptionsspektren im Vergleich mit Literaturspektren (Yuan und Chen, 1997; Yuan und Chen, 1999) über ihr DB/DII- und III/II-Verhältnis als 13-*cis*-Astaxanthin (104) und 9-*cis*-Astaxanthin (105) identifiziert.



**Abb. 12** HPLC-Chromatogramme von synthetischem all-trans-Astaxanthin (4) vor (blau) und nach (grün) der thermischen trans-cis-Isomerisierung. Die UV/VIS-Spektren zu den drei dominierenden Peaks sind in Abb. 13 dargestellt. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 3 erstellt.



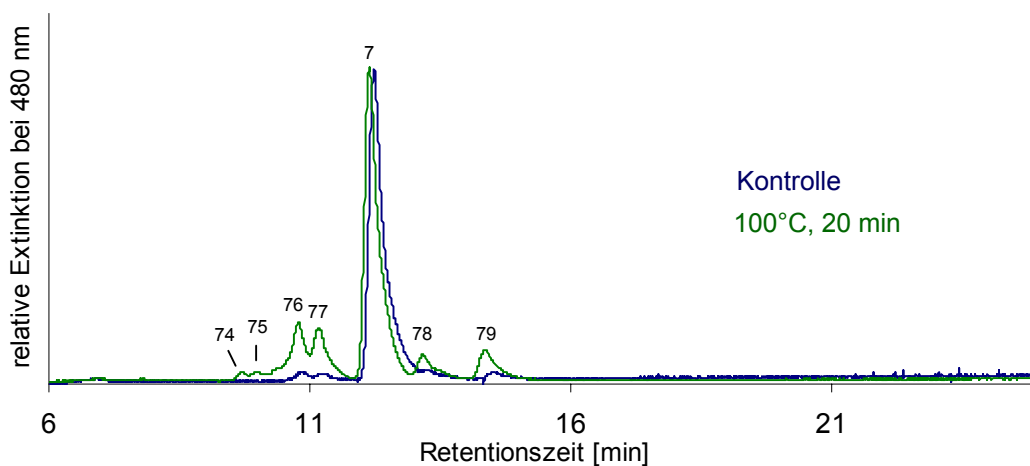
**Abb. 13** UV/VIS-Spektren der dominierenden Astaxanthin-Isomere aus der thermischen Isomerisierungsreaktion. Das Absorptionsspektrum des all-trans-Astaxanthins ist in Rot dargestellt.

### 3.1.3.4. Erstellung einer Spektrenbibliothek von cis-Isomeren des 4-Ketoluteins

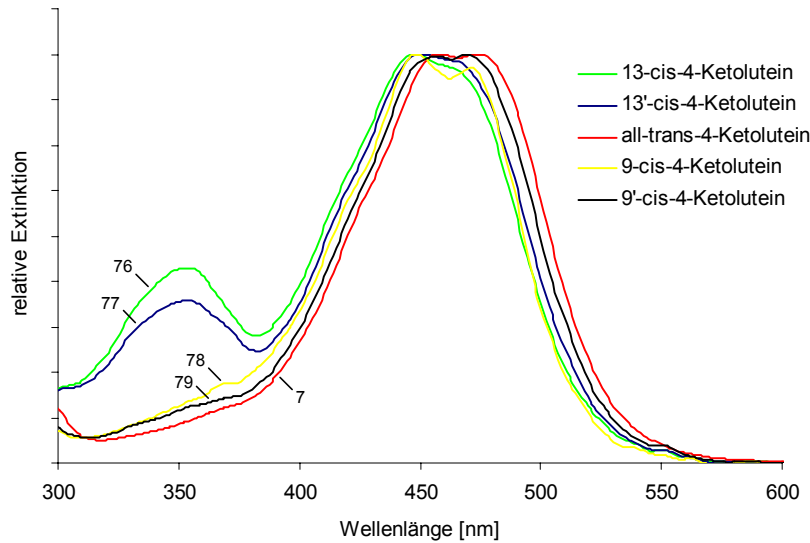
Um die *cis*-Spezies von 4-Ketolutein in den Pigmentproben der Algen identifizieren zu können, wurde auch für dieses Pigment eine Referenzbibliothek von *cis*-Isomeren erstellt. Aus Dauerstadien der Grünalge *S. rubescens* präpariertes 4-Ketolutein wurde thermisch in Toluol isomerisiert (Kapitel 2.4.6) und mittels HPLC aufgetrennt. Im Vergleich mit dem Ausgangspigment konnten die neuen Peaks 74 -79 detektiert werden (Abb. 14). Wie bei *cis*-Isomeren der Carotinoide üblich, waren die Absorptionsspektren der *cis*-Moleküle denen

der *all-trans*-Form sehr ähnlich (Britton et al., 1995). Bei genauerer Betrachtung der Peakspektren ließ sich die charakteristische *cis*-Schulter im Bereich zwischen 320 und 370 nm ausmachen, die das *all-trans*-4-Ketolutein (Peak 7) nicht aufwies. Auch der typische hypsochrome Shift war gut zu erkennen. Die Peaks 74 bis 79 ließen sich als *cis*-Derivate identifizieren. 15, 15'-*cis*-Isomere findet man im Isomerengemisch nicht als vorherrschende Form, da sie sich bei Raumtemperatur und sehr geringen Lichtintensitäten in kurzer Zeit in die *all-trans*-Form zurückverwandeln (Inhoffen et al., 1951). Die dominierenden *cis*-Derivate (76, 77 und 78, 79) konnten über ihr DB/DII- und III/II-Verhältnis als 13, 13', 9 und 9'-*cis*-Derivate des 4-Ketoluteins identifiziert werden.

Der Anteil an *all-trans*-4-Ketolutein verringerte sich durch die Isomerisierung auf 58 %. Die 13-, bzw. 13'-Isomere stellen die größten Anteile mit 12 % und 11 % unter den *cis*-Derivaten, gefolgt von den 9-, bzw. 9'-Isomeren mit 6 % und 7 % dar. Der spezifische Extinktionskoeffizient wurde *all-trans*-Ketolutein wurde geschätzt, da Literaturdaten nicht zur Verfügung standen (vgl. Kapitel 2.5.5). Für die *cis*-Derivate wurde der gleiche Koeffizient angenommen, da ebenfalls Daten in der Literatur fehlten. Die Details zur Quantifizierung sind in der Tabelle im Anhang (A.7) aufgeführt.



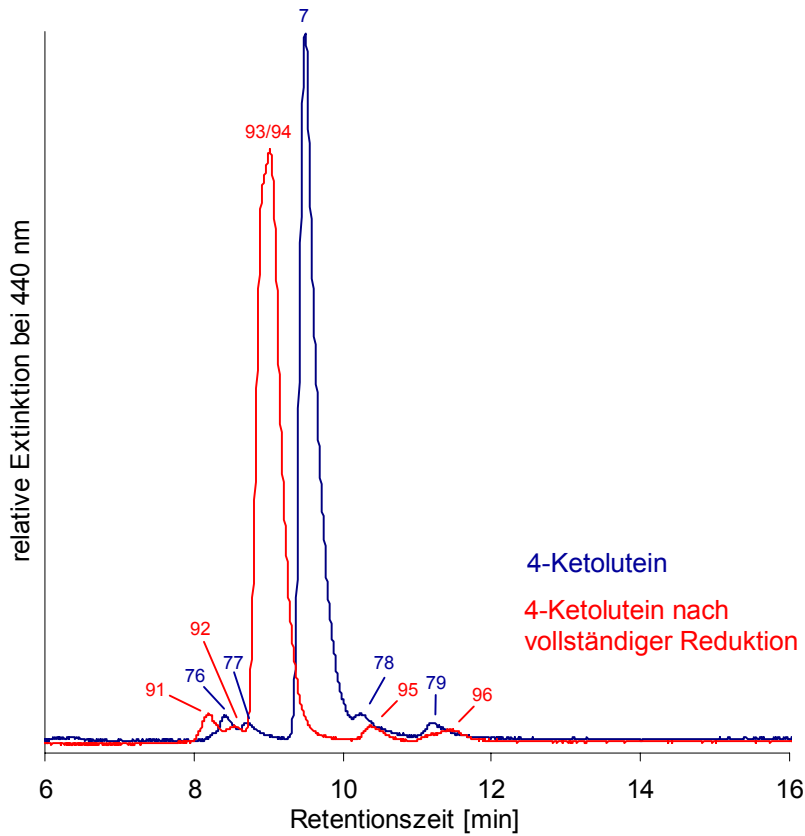
**Abb. 14** HPLC-Chromatogramme von *all-trans*-4-Ketolutein (7) vor (blau) und nach (grün) der thermischen *trans-cis*-Isomerisierung. Die UV/VIS-Spektren zu den fünf dominierenden Peaks sind in Abb. 15 dargestellt. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 3 erstellt.



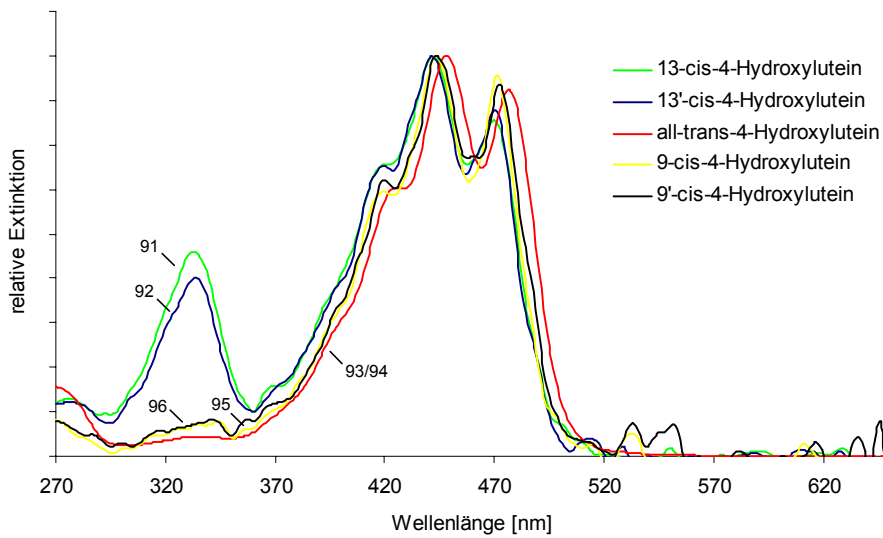
**Abb. 15** UV/VIS-Spektren der dominierenden 4-Ketolutein-Isomere aus der thermischen Isomerisierung. Das Absorptionsspektrum des all-trans-Ketoluteins ist in Rot dargestellt.

#### Vergleich der *cis-trans*-Isomere von 4-Ketolutein vor und nach Reduktion mit NaBH<sub>4</sub>

In isolierten Pigmentproben von 4-Ketolutein fand sich neben dem Hauptpeak (7) auch eine geringe Menge an *cis*-Derivaten dieses Pigments (Peak 76-79) (Abb. 16). Durch die Reduktion der Probe mit NaBH<sub>4</sub> entstand eine sehr ähnliche Abfolge der Isomerpeaks bei der Auftrennung der Pigmente mittels der HPLC-Methode 3. Bei den Peaks 93 und 94 handelte es sich um die reduzierte Form des all-*trans*-4-Ketoluteins (Abb. 16). Die *cis*-Peaks in der unreduzierten sowie in der reduzierten Probe nahmen vergleichbare Flächenanteile ein. Die Trennleistung der Methode reichte nicht aus, um die *cis*-Peaks als Doppelpeak aufzulösen. Die dominierenden *cis*-Derivate (91, 92 und 95, 96) konnten über ihr DB/DII- und III/II-Verhältnis als 13-, 13'-, 9- und 9'-*cis*-Derivate des 4-Hydroxyluteins identifiziert werden (Abb. 17). Zugrunde gelegt wurden UV/VIS-Spektren der *cis*-Lutein-Derivate (Berset und Pfander, 1985; Khachik, 1989), da die Absorptionsspektren von Hydroxylutein und Lutein nahezu identisch sind. Da die Flächenanteile der *cis*-Peaks vor und nach der Reduktionsreaktion vergleichbar waren, sollte es sich auch bei den vier prominenten Vertretern der unreduzierten *cis*-Derivate des 4-Ketoluteins um die 13-, 13'-, 9- und 9'-*cis*-Derivate handeln.



**Abb. 16** HPLC-Chromatogramme von 4-Ketolutein vor (blau) und nach (rot) der thermischen trans-cis-Isomerisierung. Die UV/VIS-Spektren zu den dominierenden Peaks sind in Abb. 15 und Abb. 17 dargestellt. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 3 erstellt.



**Abb. 17** UV/VIS-Spektren der dominierenden 4-Hydroxyluteinisomere aus der thermischen Isomerisierung. Das Absorptionsspektrum des all-trans-Hydroxyluteins ist in Rot dargestellt.

### **3.1.4. Untersuchung der Gesamtzusammensetzung der Pigmente in algalen Dauerstadien**

#### **3.1.4.1. Analyse der Pigmentstöchiometrien ausgewählter Grünalgen durch Untersuchung verseiften Pigmentextrakte und deren selektiver Reduktion mit NaBH<sub>4</sub>**

Untersuchungen der Pigmentzusammensetzung von *H. pluvialis* haben gezeigt, dass ein großer Teil der Pigmente in den Aplanosporen nicht als freie Pigmente, sondern in acylierter Form mit Fettsäuren vorliegt (Renstom and Liaaen-Jensen, 1981; Miao et al., 2006; Lemoine et al., 2008). Die Fettsäuren hatten überwiegend Kettenlängen von 16 und 18 Kohlenstoffatomen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Auftrennung der Pigmentextrakte aus Algen eine C18-Säule verwendet (HPLC-Methode 2). Die Säule mit zugehörigem Eluentengradienten trennte die Analyte nach ihrer Polarität auf. Polare Pigmente eluieren früher als unpolare Pigmente. Carotinoide sind auf Grund ihres langgestreckten Kohlenwasserstoffgerüsts unpolare Moleküle. Carotinoide mit Sauerstofffunktionen wie Hydroxygruppen und Ketogruppen sind etwas polarer, jedoch noch immer als hydrophob zu bezeichnen. Ketocarotinoide, die mit C<sub>16</sub> oder C<sub>18</sub> Fettsäuren verestert sind, werden durch deren langen Kohlenwasserstoffketten unpolarer. Freie Pigmente eluieren damit früher als acylierte, und monoacylierte früher als diacylierte Ketocarotinoide.

Der Vergleich des in der vorliegenden Arbeit analysierten *H. pluvialis*-Extrakts (Abb. 7) mit Literaturdaten legte zunächst den Schluss nahe, dass es sich bei den zahlreichen Pigmenten, die von Peak 19 (Canthaxanthin) und 50 (β-Carotin) begrenzt wurden, um Ketocarotinoidmonoacylester handelte, abgesehen von Echinenon (27), Chlorophyll b (21) und Chlorophyll a (26). Diese Peaks werden im Folgenden als Monoacylester oder Monoester bezeichnet. Als Diacylester werden nachfolgend die Pigmente zusammengefasst, die eine Retentionszeit später als Peak 50 (β-Carotin) aufwiesen.

Im Bereich der Peaks der vermeintlichen Mono- und Diacylester aus *H. pluvialis* traten in den Chromatogrammen der anderen Algen (Abb. 7) noch weitere Peaks auf. Insgesamt ließen sie sich zunächst mit Hilfe ihrer UV/VIS Spektren in zwei Gruppen einordnen. Eine Gruppe mit Astaxanthin- und eine Gruppe mit 4-Ketolutein-Absorptionsspektren. Diese beiden Gruppen beinhalteten sowohl die all-*trans* Formen der beiden Spezies als auch deren *cis*-Formen. Aus *H. pluvialis* ist bekannt, dass es sich bei den acylierten Pigmenten hauptsächlich um Astaxanthinacylester handelt. Daraus wurde die Vermutung aufgestellt,

dass es sich bei den Pigmenten mit 4-Ketoluteinspektrum um acylierte Pigmentspezies des 4-Ketoluteins handeln könnte. Da bei den Peaks mit einer späteren Retentionszeit als  $\beta$ -Carotin (50/51) keine 4-Ketolutein-Spektren auftraten, mit der Ausnahme des Pigments 52), wurde vermutet dass von 4-Ketolutein keine Diacyl ester existieren, sondern ausschließlich Monoacyl ester. Möglicherweise sei Peak 52 ein 4-Ketoluteinmonoacyl ester, der auf Grund der vom Astaxanthinmonoacyl ester abweichenden Molekülgestalt eine etwas verlängerte Retentionszeit aufweist. Damit wären alle Peaks mit einer längeren Retentionszeit als Peak 52 als Diacyl ester zu bezeichnen.

Für die Identifikation der Ketocarotinoidacyl ester und die Pigmentzusammensetzung der Ketocarotinoide in den Dauerstadien der Grünalgen wurden eine Reihe von biochemischen Analysen durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden vorgestellt werden.

Zur Analyse der Pigmentzusammensetzung der Grünalgen wurden die Pigmente unter milden Bedingungen bei Sauerstoffausschluss verseift (siehe Kapitel 2.4.4). Durch die Verseifung konnten die Fettsäuren von den Pigmenten abgespalten werden. Damit lagen die Pigmente in ihrer freien Form vor, was die Identifikation erleichterte und die Bestimmung der Gesamtzusammensetzung der Carotinoide in den Pigmentextrakten ermöglichte. Der Ausschluss von Sauerstoff war nötig, da ansonsten unter den basischen Reaktionsbedingungen das Oxidationsprodukt Astacen entstehen kann, das mit der gewählten HPLC-Methode 2 nicht aufgetrennt werden konnte. Bei der Verseifung musste in Kauf genommen werden, dass auch die Chlorophylle hydrolysiert werden.

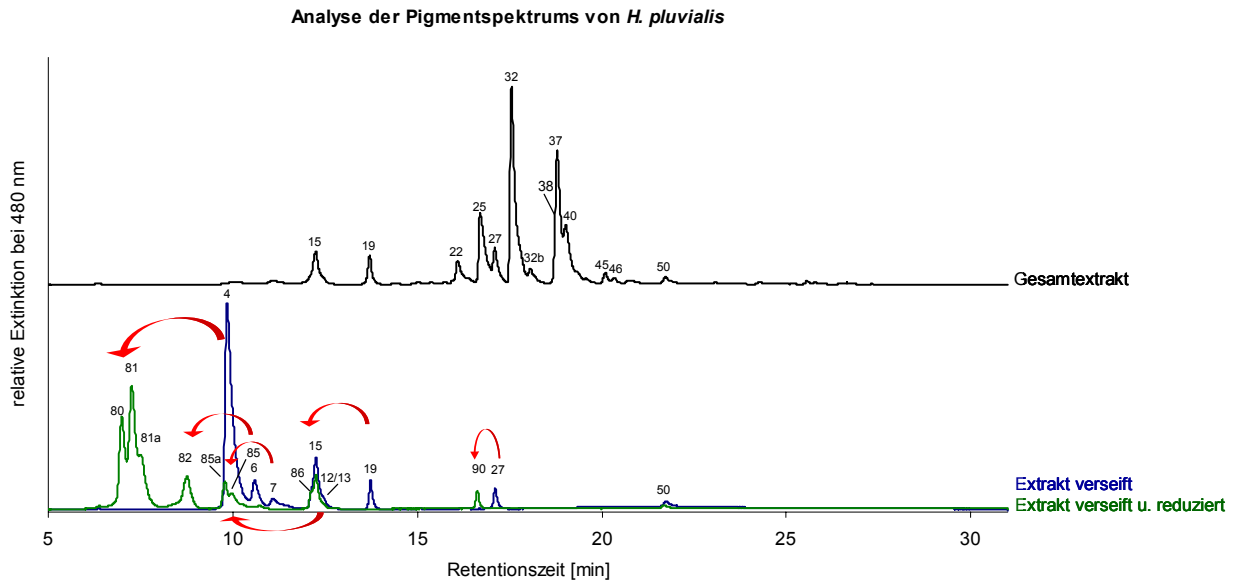
In einer zweiten Stufe wurden die verseiften Proben noch zusätzlich reduziert. Die Ketogruppen der Ketocarotinoide wurden selektiv mit  $\text{NaBH}_4$  zu Hydroxygruppen reduziert, um eine zusätzliche Identifikationsmöglichkeit für die Pigmentpeaks zu erhalten. In den Ketocarotinoiden die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, stand die Ketogruppe an Position vier des  $\beta$ -Iononrings und damit in Konjugation zu den Doppelbindungen des Chromophors des Carotinoidmoleküls. Daraus resultierte der spektrale Unterschied der Carotinoide mit dieser funktionellen Gruppe zu dem typischen dreigipfligen Spektrum des all-*trans*  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotins. Durch die Reduktion der Ketogruppe fiel diese Doppelbindung weg und das  $\pi$ -Elektronensystem/ Chromophor wurde verkürzt. Folglich glichen die Chromophore und damit auch die Spektren von  $\alpha$ -Ketocarotinoiden nach der Reduktion dem Spektrum des nicht reduzierten Vorläuferpigmentes, dem  $\alpha$ -Carotin (siehe Anhang, A.9). Die Spektren von  $\beta$ -Carotin abgeleiteten vollständig reduzierten Ketocarotinoiden glichen dem Spektrum von  $\beta$ -Carotin (siehe Anhang, A.9).

### **3.1.4.2. Analyse der Pigmentzusammensetzung in reifen Aplanosporen von *H. pluvialis***

Im Pigmentextrakt der drei Monate alten Aplanosporen von *H. pluvialis* wurde freies Astaxanthin, Canthaxanthin und Echinenon detektiert (Abb. 18). *H. pluvialis* ist die einzige Alge in dieser Untersuchungsreihe, bei der kein freies 4-Ketolutein nachgewiesen werden konnte. Abgesehen davon sah das Pigmentmuster des Totalextraktes zunächst ähnlich aus wie das der Dauerstadien der anderen Algen. Die Verseifung zeigte, dass die Pigmentzusammensetzung deutlich von Astaxanthin dominiert wird. Mit über 70% Anteil am Gesamtcarotinoidgehalt wies *H. pluvialis* den höchsten Astaxanthinanteil in den hier untersuchten Algen auf. Außerdem wurde das Pigment Adonirubin (12/13) detektiert. Seine Identität wurde in der Analyse der Monoacyl ester von *H. pluvialis* durch Reduktion bestätigt (Abb. 18). Das in Bakterienversuchen hergestellte Adonirubin, das als Zwischenprodukt bei der Biosynthese von Astaxanthin aus Canthaxanthin mittels der BKT auftrat, diente als Referenzpigment (Kapitel 3.3.3.1 und Anhang, A.8). Im verseiften Gesamtextrakt wurde eine geringe Menge von 4-Ketolutein gefunden, das in den untersuchten Proben jedoch maximal 4% darstellte.

Der Verseifung des Pigmentextraktes folgte eine Reduktion mit NaBH<sub>4</sub>. Dabei wurde unter anderem das Reduktionsprodukt des Astaxanthins, Crustaxanthin (80, 81) und *cis*-Crustaxanthin (82) detektiert. Crustaxanthin wies ein dem *all-trans*-Zeaxanthin vergleichbares Spektrum auf (Anhang, A.9). Das *cis*-Crustaxanthin-Spektrum war dem Spektrum von *cis*-Zeaxanthin vergleichbar. *All-trans*-Crustaxanthin konnten zweifelsfrei über eine Datenbank von Astaxanthin-Reduktionsprodukten (Werner, 2011) identifiziert werden. Die Identifikation der übrigen reduzierten Pigmentspezies erfolgte anhand der Spektren und der Retentionszeiten.



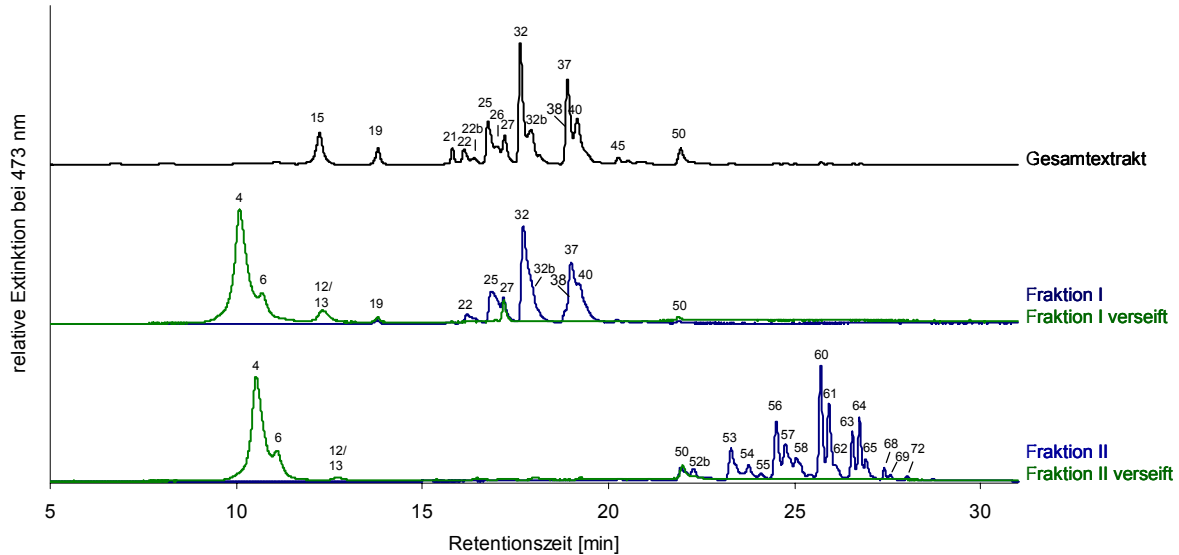


**Abb. 18** HPLC-Chromatogramm von Pigmentextrakt aus reifen Aplanosporen der Grünalge *H. pluvialis* (schwarz), dem verseiften Pigmentextrakt (blau) und dem verseiften und anschließend mit  $\text{NaBH}_4$  reduziertem Pigmentextrakt (grün). Lutein (15) und  $\beta$ -Carotin (50) sind Pigmente, die auch in vegetativen Zellen zu finden sind. Astaxanthin (4), Canthaxanthin (19) und Echinenon (27) stellen die freien Ketocarotinoide dar. Die Pigmente 22-46 stellen die Ketocarotinoidmonoacyl ester und die Pigmente mit einer Retentionszeit größer als 22 Minuten die Ketocarotinoiddiacyl ester dar. In der reduzierten Probe wurde unter anderem Crustaxanthin (80, 81) und *cis*-Crustaxanthin (82) vorläufig identifiziert. Eine detaillierte Zuordnung der Nummern zu ihren Pigmentnamen ist in der Tabelle 1 aufgeführt. Zur Erstellung der Chromatogramme wurde die HPLC-Methode 2 verwendet.

### 3.1.4.3. Analyse der Pigmentzusammensetzung in den Ketocarotinoid-Mono- und – Diacylestern aus reifen Aplanosporen von *H. pluvialis*

Um die Pigmentanteile in den Mono- und Diacylestern untersuchen zu können, wurden Proben von drei Monate alten Aplanosporen von *H. pluvialis* fraktioniert (Kapitel 2.4.3). Dabei wurden zwei Fraktionen hergestellt. Eine Fraktion I, die die Ketocarotinoidmonoacyl ester und eine Fraktion II, die die Ketocarotinoiddiacyl ester enthält. Anschließend wurden die beiden Fraktionen I und II (Abb. 19) unter milden basischen Bedingungen und Sauerstoffausschluss verseift, um die Pigmentanteile von den Fettsäuren in den Acylestern abzuspalten. Die Analyse der Monoacyl esterfraktion (Fraktion I, Abb. 19) ergab eine Pigmentzusammensetzung mit einem Hauptanteil an Astaxanthin (inklusive *cis*-Astaxanthin) und geringen Mengen an Adonirubin (Abb. 19). Die Stöchiometrie von Canthaxanthin und Echinenon wurden durch die Verseifung nicht verändert. Daraus lässt sich ableiten, dass die Pigmentanteile in den Monoacylestern aus Astaxanthin und Adonixanthin bestanden. 4-Ketolutein konnte weder in den Monoacylestern noch in den Diacyl esterfraktionen

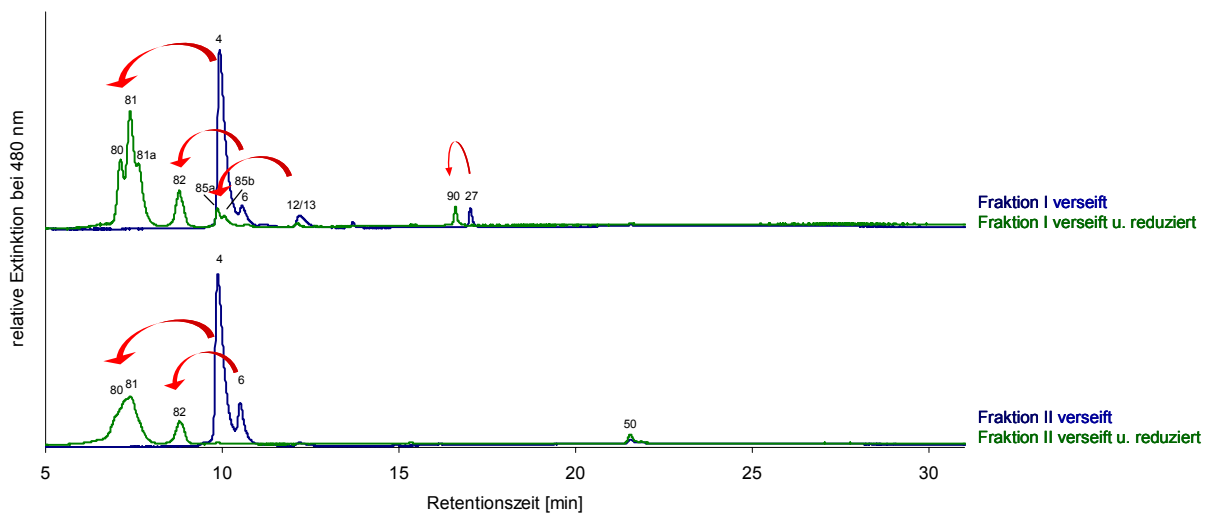
nachgewiesen werden. Die Verseifung der Diesterfraktion (Fraktion II, Abb. 19) ergab eine Pigmentzusammensetzung von 98% Astaxanthin und 2% Adonixanthin, wenn man das freie  $\beta$ -Carotin nicht berücksichtigt, dass auch schon in der unverseiften Probe vorlag.



**Abb. 19** Chromatogramme von fraktionierten Pigmentextrakten aus 3 Monate alten Aplanosporen von *H. pluvialis* und deren Verseifungsprodukte. In schwarz ist ein Chromatogramm des Gesamtextrakts dargestellt. In der Mitte ein Chromatogramm der Fraktion I mit den Monoacylestern 22-25 und 27-45, sowie Canthaxanthin (19) und  $\beta$ -Carotin (50) (blau). Das Ergebnis der Verseifung von Fraktion I ist in Grün dargestellt. Durch die Hydrolysereaktion wurden Astaxanthin (4), *cis*-Astaxanthin (6) und Adonirubin (12/13) frei. Im unteren Drittel ist die Fraktion II (blau) dargestellt, die die Ketocarotinoiddiacylester 52b-72 enthielt. In Grün ist das Verseifungsprodukt dieser Fraktion gezeigt. Eine detaillierte Zuordnung der Nummern zu ihren Pigmentnamen ist in der Tabelle 1 aufgeführt. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 2 erstellt.

Die Reduktion der verseiften Pigmentfraktionen von *H. pluvialis* bestätigte die Identität der Pigmente (Abb. 20). Die Reduktion mit Natriumborhydrid wandelte das mengenmäßig größte Pigment Astaxanthin (4) in Crustaxanthin (80, 81, 81a), mit dem typischen dem Zeaxanthin ähnlichen Spektrum um. 4-Hydroxylutein (83 und 84), die Reduktionsprodukte des 4-Ketoluteins konnten nicht detektiert werden. Die Pigmente 85a und 85b zeigten ein  $\beta$ -Carotin-Spektrum und stammten von Adonirubin (12/13). Echinenon (27) wurde zu 4-Hydroxy- $\beta$ -Carotin (90) reduziert. Gleiches wurde bei der Reduktion der verseiften Diacylesterfraktionen beobachtet. Astaxanthin (4) und *cis*-Astaxanthin (6) wurden zu Crustaxanthin (80 und 81) sowie *cis*-Crustaxanthin (82) reduziert. All-*trans*-Astaxanthin und Canthaxanthin konnten zweifelsfrei über Referenzpigmente, ihre Reduktionsprodukte über eine Reduktionsdatenbank zu diesen Pigmenten (Werner 2011) identifiziert werden. Die

Identifikation der übrigen reduzierten Pigmentspezies erfolgte vorläufig anhand der Spektren und der Retentionszeiten.

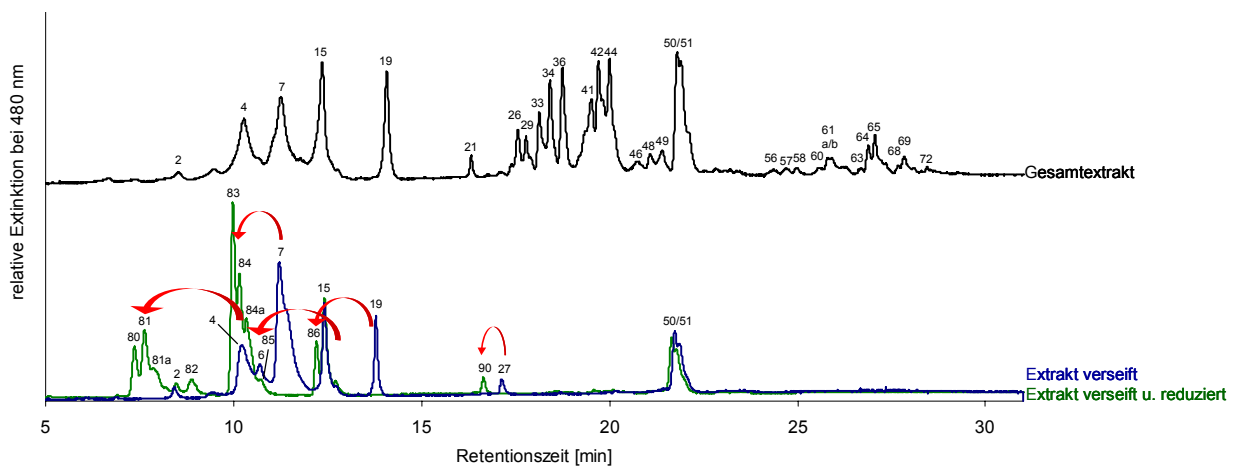


**Abb. 20** HPLC-Chromatogramme von verseiften Fraktionen des Pigmentextrakts aus 3 Monate alten Aplanosporen von *H. pluvialis*. Die oberen Chromatogramme zeigen die Fraktion I die die Monoacylster enthielt (blau) und die Reduktionsprodukte dieser Probe (grün). Unten die Diacylsterfraktion in Blau vor bzw. nach ihrer Reduktion in Grün. Eine detaillierte Zuordnung der Nummern zu den Pigmentnamen ist in der Tabelle 1 aufgeführt. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 2 erstellt.

#### 3.1.4.4. Analyse der Pigmentzusammensetzung in reifen Zygoten von *C. reinhardtii*

Die obere Hälfte der Abb. 21 zeigt das HPLC-Chromatogramm eines Pigmentextraktes aus drei Monate alten Zygosporen von *C. reinhardtii*. Die Ketocarotinoide Astaxanthin (4), 4-Ketolutein (7) und Canthaxanthin (19) lagen in ungefähr gleichen Anteilen als freie Pigmente vor. Die Verseifung des Pigmentextraktes unter milden Bedingungen in Stickstoffatmosphäre bestätigte die Anwesenheit eines weiteren freien Pigments, des Echinenons (27) (Abb. 21). Dieses Pigment lag auch im unverseiften Extrakt vor, wurde aber in der verwendeten HPLC Methode nicht vollständig vom Chlorophyll a separiert. Auch  $\beta$ -Carotin (50/51), Lutein (15) und Violaxanthin (2) wurden in den Zygosporen gefunden. Durch die Verseifungsreaktion reduzierte sich die Anzahl der Pigmentpeaks in den Chromatogrammen stark. Die zahlreichen Acylsterpeaks waren in der verseiften Probe nicht mehr zu finden (Abb. 21 unten). Die Menge an Astaxanthin und 4-Ketolutein steig entsprechend an. Die Stöchiometrien der übrigen freien Pigmente blieben unverändert. Dies bestätigte, dass die Pigmentanteile der Acylster Astaxanthin bzw. 4-Ketolutein beinhalteten.

Die Reduktion des verseiften Pigmentextraktes mit Natriumborhydrid bestätigte die Identität von Astaxanthin (4), das zu Crustaxanthin (80, 81 und 81a) reduziert wurde. Der Peak 6, bei dem es sich nach vorläufiger Identifizierung im Vergleich mit der *cis*-Astaxanthin-Bibliothek um das 13-*cis*-Isomer des Astaxanthins handelte, wurde zu *cis*-Crustaxanthin (82) reduziert (vorläufige Identifizierung). Das Reduktionsprodukt des mengenmäßig dominierende Pigments 4-Ketolutein, das 4-Hydroxylutein (83, 84 und 84a) fand sich auch in der reduzierten Probe als mengenmäßig dominierendes Pigment wieder. Canthaxanthin (19) wurde zu Isozeaxanthin (86) reduziert und Echinenon (27) zu 4-Hydroxy- $\beta$ -carotin (90). Wie erwartet wurden die Pigmente Violaxanthin, Lutein und  $\beta$ -Carotin, die keine Ketogruppen tragen, durch die Reaktion mit Natriumborhydrid nicht verändert.



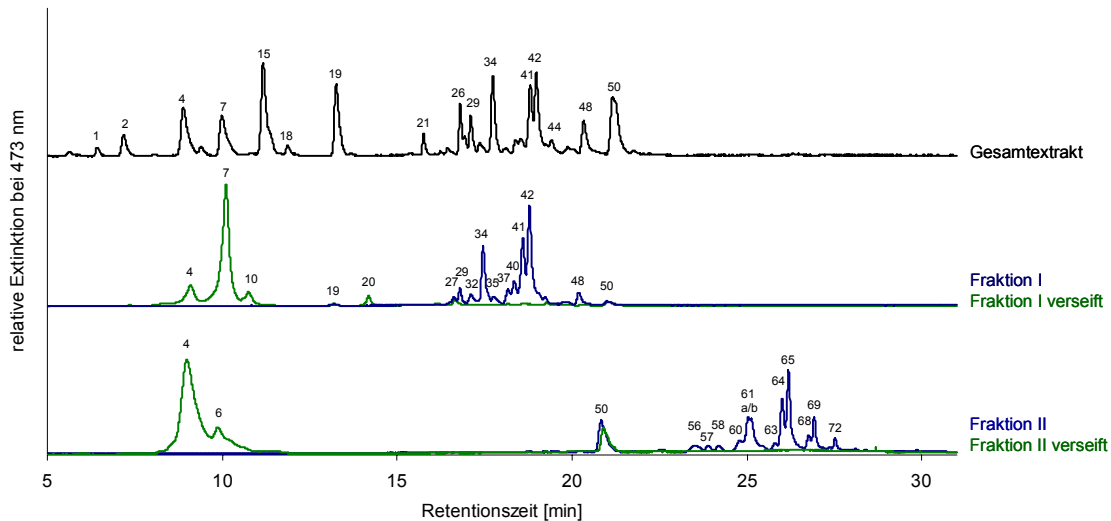
**Abb. 21** HPLC-Chromatogramm von Pigmentextrakt aus reifen Zygosporen der Grünalge *C. reinhardtii* (schwarz), dem verseiften Pigmentextrakt (blau) und dem verseiften und anschließend mit  $\text{NaBH}_4$  reduziertem Pigmentextrakt (grün). Violaxanthin (2), Lutein (15), Chlorophyll b (21), Chlorophyll a (26) und  $\beta$ -Carotin (50) waren auch in vegetativen Zellen zu finden. Astaxanthin (4), 4-Ketolutein (7), Canthaxanthin (19) und Echinenon (27) stellen die freien Ketocarotinoide dar. Die Pigmente 29-49 stellen die Ketocarotinoidmonoacyl ester und die Pigmente 56-72 die Ketocarotinoiddiacyl ester dar. Die Pigmente 4-Hydroxy- $\beta$ -carotin (90), Crustaxanthin (80, 81, 81a), 4-Hydroxylutein (83, 84, 84a) sowie Isozeaxanthin (86) wurden im verseiften und reduzierten Pigmentextrakt identifiziert. Zur Erstellung der Chromatogramme wurde die HPLC-Methode 2 verwendet.

**3.1.4.5. Analyse der Pigmentzusammensetzung in den Ketocarotinoid-Mono- und – Diacylestern aus reifen Zygosporen von *C. reinhardtii***

In der Abb. 22 sind Chromatogramme zur Analyse der Pigmentzusammensetzung in den Ketocarotinoid-mono- und –diacylestern dargestellt. Fraktion I enthielt fast ausschließlich Ketocarotinoidmonoacylester. Durch die Verseifung der Fraktion I unter Sauerstoffausschluss wurden die Pigmentanteile von den Fettsäuren getrennt. In der Fraktion I stellen 4-Ketolutein (7) und *cis*-4-Ketolutein (10) den Hauptanteil der Pigmente dar. Daneben wurde ein Astaxanthin-Peak (4) detektiert. Außerdem wurden Canthaxanthin (19), Echinenon (27),  $\beta$ -Carotin (50), sowie ein nicht näher identifizierbares Produkt (20) gefunden. Canthaxanthin, Echinenon und  $\beta$ -Carotin waren bereits in der unverseiften Probe als freie Pigmente enthalten. Sie wurden durch die Verseifung nicht verändert und lagen nach der Reaktion im gleichen stöchiometrischen Verhältnis vor. Daraus lässt sich schließen, dass die Pigmentanteile in den Monoacylestern zum größten Teil aus 4-Ketolutein bestanden, sowie aus einem deutlich geringeren Teil aus Astaxanthin.

In der Fraktion II, die neben  $\beta$ -Carotin (20) die Diester beinhaltet, wurde kein 4-Ketolutein (7) detektiert. Die Pigmentzusammensetzung der Fraktion II bestand aus Astaxanthin (4) und *cis*-Astaxanthin (6), sowie Adonirubin und  $\beta$ -Carotin (50). Durch die Verseifungsreaktion wurde  $\beta$ -Carotin nicht verändert. Daraus lässt sich schließen, dass die Pigmentanteile der Diacylesterfraktion fast vollständig aus Astaxanthin bestanden. 4-Ketolutein wurde nicht nachgewiesen.

Aus der Quantifizierung der Pigmentanteile der Fraktion I und Fraktion II kann keine exakte Zusammensetzung der Mono- bzw. Diacylester abgeleitet werden, denn durch die Fraktionierung können die Pigmentstöchiometrien, die im Gesamtextrakt vorherrschen, nicht zu 100% genau abgebildet werden. Es ist damit zu rechnen, dass die Pigmente am Rande der Fraktionsgrenzen gegenüber den Pigmenten in der Fraktionsmitte einen etwas geringeren Anteil als im Gesamtextrakt aufweisen.



**Abb. 22** Chromatogramme von fraktionierten und verseiften Pigmentextrakten aus 3 Monate alten Zygosporen von *C. reinhardtii*. Das Chromatogramm des Gesamtextraktes ist in Schwarz dargestellt. In der Mitte sind die Fraktion I mit den Monoacylestern in Blau und in Grün das Ergebnis ihrer Verseifung dargestellt. Durch die Hydrolysereaktion erhöht sich der Anteil der freien Ketocarotinoide Astaxanthin (4) und 4-Ketolutein (7) bzw. *cis*-Astaxanthin (6) und *cis*-4-Ketolutein (10). Im unteren Drittel sind die Fraktion II (blau) und ihr Verseifungsprodukt (grün) gezeigt. Eine detaillierte Zuordnung der Peaknummern zu ihren Pigmentnamen ist in der Tabelle 1 aufgeführt. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 2 erstellt.

### 3.1.4.6. Analyse der Pigmentzusammensetzung in reifen Aplanosporen von *F. tuberosa*

Bei der Betrachtung der Chromatogramme von Pigmentextrakten aus drei Monate alten reifen Aplanosporen der Grünalge *F. tuberosa* (Abb. 7, Abb. 23) fiel zunächst der ungewöhnlich hohe Echinenon-Peak (27) auf. Eine solch hohe Konzentration an Echinenon wies keine der anderen Algen in ihren Dauerstadien auf. Das Echinenon wurde über sein Spektrum im Vergleich mit Literaturspektren (Britton et al., 2004), sowie über seine Retentionszeit, die zwischen  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin liegt, identifiziert. Außerdem konnte Echinenon als Zwischenprodukt der Ketolierungsreaktion der  $\beta$ -Carotin-Ketolase (BKT) aus *C. reinhardtii* bei heterologer Expression in  $\beta$ -Carotin-haltigen *E. coli* von  $\beta$ -Carotin zu Canthaxanthin nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.3.2.1 und Anhang A.8). Der Pigmentpeak von Echinenon (27) fand sich in der mit Natriumborhydrid reduzierten Probe (Abb. 24) als Peak mit einem ähnlich hohen Flächenanteil und einer etwas verkürzten Retentionszeit wieder. Dieser Peak 90 wies ein dem  $\beta$ -Carotin vergleichbares Spektrum auf (Anhang, A.9) und wurde vorläufig als 4-Hydroxy- $\beta$ -carotin identifiziert. Wird die Ketogruppe

am C-Atom 4 des Echinenons reduziert, erhält man 4-Hydroxy- $\beta$ -carotin. Auch die Reduktion stützt damit zusätzlich die Identifikation (Abb. 24).

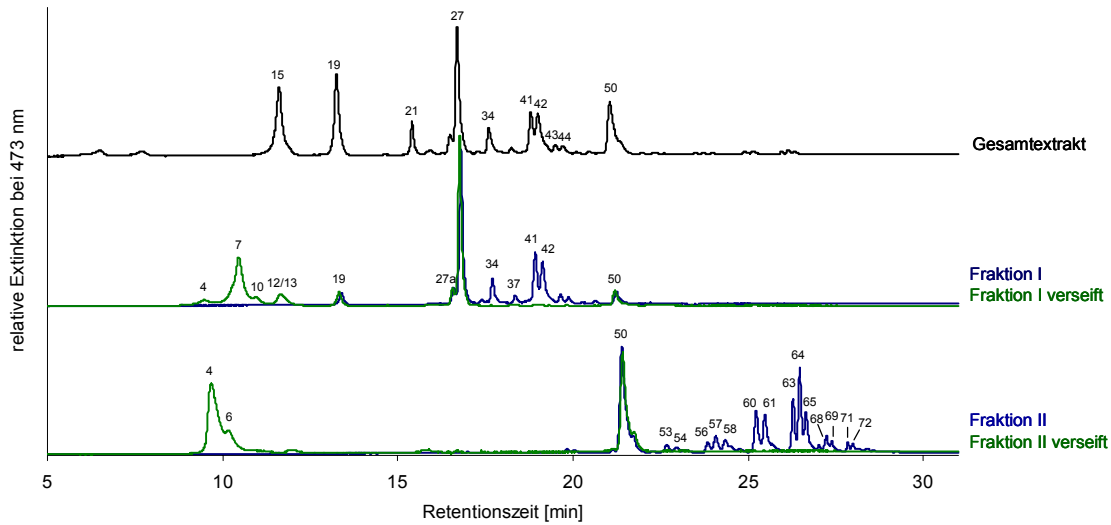
Freies Astaxanthin und freies 4-Ketolutein konnten in den Aplanosporen von *F. tuberosa* nur in sehr geringen Mengen detektiert werden (Abb. 7, Abb. 23). Astaxanthin und 4-Ketolutein lagen bis auf diese sehr geringen Mengen in acylierter Form vor. 4-Ketolutein war das höchstkonzentrierte Pigment unter den Ketocarotinoiden aus den *F. tuberosa* Aplanosporen, gefolgt von Astaxanthin, Echinenon und Canthaxanthin.

Der Trivialname des 4-Ketoluteins ist Fritschiellaxanthin. Er wurde vergeben, da das bis dahin unbekannte Pigment in *Fritschiella tuberosa* entdeckt wurde (Weber, 1975). Der Name des Organismus wurde später als Namensgeber des Pigments (Buchecker et al., 1978) verwendet.

#### **3.1.4.7. Analyse der Pigmentzusammensetzung in den Ketocarotinoid-Mono- und – Diacylestern aus reifen Aplanosporen von *F. tuberosa***

Die Verseifung der Monoacylsterfraktion (Abb. 23, Fraktion I) zeigte, dass der Pigmentanteil der Ketocarotinoidmonoacylster zu 75% aus 4-Ketolutein bestand. Astaxanthin stellte nur einen Anteil von 10% dar. Außerdem wurde Adonirubin mit einem Anteil von 15% nachgewiesen. Die Identifikation des Pigments Adonirubin erfolgte über sein Spektrum im Vergleich zum Literaturspektrum (Britton et al., 2004). Darüber hinaus wurde auch dieses Pigment als Zwischenprodukt der Ketolierungsreaktion von Canthaxanthin zu Astaxanthin durch die BKT aus *C. reinhardtii* nachgewiesen. Die Pigmente Canthaxanthin, Adonirubin und Astaxanthin tragen das gleiche Chromophor. Sie unterscheiden sich nur durch Hydroxylierung an der Position 3 des Iononrings. Die Spektren glichen sich bis auf eine Verschiebung von ca. 2 nm, wobei das Maximum des Spektrums von Adonirubin zwischen dem von Canthaxanthin und Astaxanthin lag (vgl. Anhang, A.9).

Als Produkt der Verseifung der aufkonzentrierten Diacylsterfraktion wurde auch bei *F. tuberosa* kein 4-Ketolutein nachgewiesen. Der Pigmentanteil von Astaxanthin in den Ketocarotinoiddiacylestern inklusive der *cis*-Spezies lag bei 95%. Daneben lagen 5% als Adonirubinacylster vor.

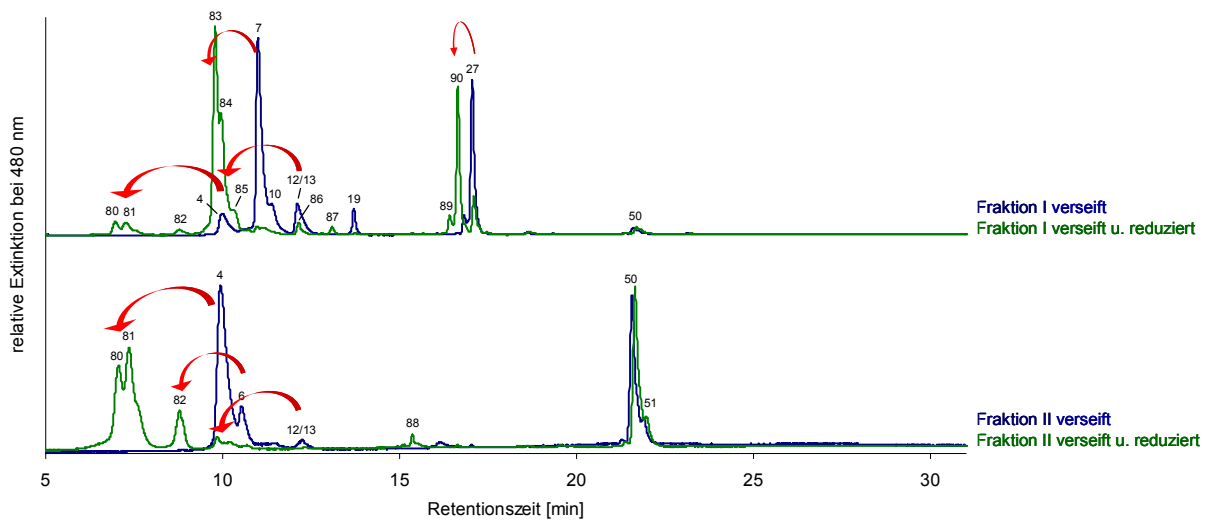


**Abb. 23** Chromatogramme von Pigmentextrakten aus 3 Monate alten Aplanosporen von *F. tuberosa*. Das Chromatogramm des Gesamtextraktes ist in Schwarz dargestellt. In der Mitte sind die Fraktion der Monoacylster in Blau und in Grün das Ergebnis ihrer Verseifung dargestellt. Im unteren Drittel sind die Fraktion II (blau) und ihr Verseifungsprodukt (grün) gezeigt. Die freien Ketocarotinoide im Gesamtextrakt waren vor allem Canthaxanthin (19) und Echinenon (27). Durch die Hydrolysereaktionen erhöht sich der Anteil der freien Ketocarotinoide Astaxanthin (4) und 4-Ketolutein (7) bzw. *cis*-Astaxanthin (6) und *cis*-4-Ketolutein (10), sowie von Adonirubin (12 / 13). Eine detaillierte Zuordnung der Peaknummern zu ihren Pigmentnamen ist in der Tabelle 1 aufgeführt. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 2 erstellt.

Die Reduktion der verseiften Fraktionen von *F. tuberosa* mit Natriumborhydrid (Abb. 24) bestätigte als zusätzlicher Nachweis die Identität der Pigmente. Die Spektren 80, 81, 82, 85, 90, die aus der Reduktion hervorgingen, wiesen ein typisches  $\beta$ -Carotin-Spektrum auf und die Pigmente 83 und 84 ein typisches  $\alpha$ -Carotin-Spektrum. Die Zuordnung der jeweiligen Peaks in der reduzierten Form zur unreduzierten Form konnte sehr leicht über die Flächenanteile erfolgen, da sich die molaren Extinktionskoeffizienten der hier vorliegenden Carotinoide bei 440 nm nur wenig unterschieden. Durch die Reaktion wurde das mengenmäßig größte Pigment 4-Ketolutein (7) zu 4-Hydroxylutein (83 und 84) reduziert. Echinenon (27) wurde zu 4-Hydroxy- $\beta$ -Carotin (90) reduziert. Die Fraktion II mit den verseiften Diacylestern bestand hauptsächlich aus Astaxanthin (4) und *cis*-Astaxanthin (6) und ihren Reduktionsprodukten Crustaxanthin (80 und 81) sowie *cis*-Crustaxanthin (82).  $\beta$ -Carotin (50, 51) wurden nicht reduziert, da das Pigment keine Ketogruppen enthielt. Die Identifikation der reduzierten Pigmente erfolgte vorläufig anhand von Vergleichen der Spektren mit Literaturdaten (Britton et al., 2004) und der Retentionszeit. Von den Pigmenten



4-Ketolutein, Canthaxanthin und Astaxanthin lagen zudem Datenbanken mit den Reduktionsprodukten vor (diese Arbeit und Werner, 2011).



**Abb. 24** HPLC-Chromatogramme von verseiften Fraktionen des Pigmentextrakts aus Aplanosporen von *F. tuberosa* und deren Reduktionsprodukten. Die Fraktion der Monoacyl ester nach ihrer Verseifung ist in Blau im oberen Diagramm dargestellt. Auf derselben Höhe ist ein Chromatogramm der gleichen Probe nach ihrer Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  abgebildet (grün). Die unteren Chromatogramme zeigen die verseifte Diesterfraktion (blau) und die verseifte Diesterfraktion nach der Reduktion (grün). Eine detaillierte Zuordnung der Nummern zu den Pigmentnamen ist in der Tabelle 1 aufgeführt. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 2 erstellt.

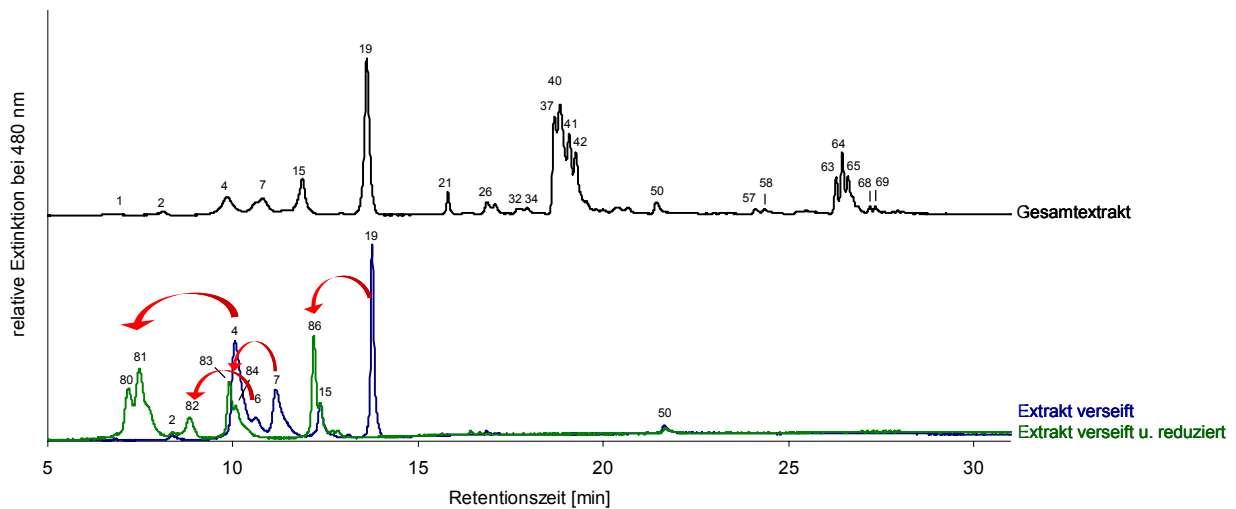
### 3.1.4.8. Analyse der Pigmentzusammensetzung in reifen Aplanosporen von *M. zofingiensis*

Das Pigmentspektrum von 3 Monate alten Aplanosporen der Grünalge *M. zofingiensis* (Abb. 25) zeigte im Mono- und Diacyl esterbereich deutlich weniger Peaks als die der übrigen Algen. Die Peaks 37, 40, 41 und 42 dominierten den Monoesterbereich, wobei die Peaks 37 und 40 ein Astaxanthin-Spektrum aufwiesen und die Peaks 41 und 42 ein 4-Ketoluteinspektrum. Das ließ den Schluss zu, dass es sich bei 37 und 40 um Astaxanthinmonoacyl ester und 41 und 42 um 4-Ketoluteinmonoacyl ester handelt. Im Bereich der Diester dominierten die Peaks 63, 64 und 65 mit Astaxanthin-Spektrum.

Nach der Verseifung waren die Mono- und Diesterpeaks nicht mehr zu beobachten. Die Pigmentzusammensetzung wurde von den Ketocarotinoiden dominiert.

Die Reduktion des verseiften Extraktes mit Natriumborhydrid bestätigte auch hier wieder die Identität der Ketocarotinoide. 4-Ketolutein (7) wurde in der Reaktion zu 4-Hydroxylutein (83 /

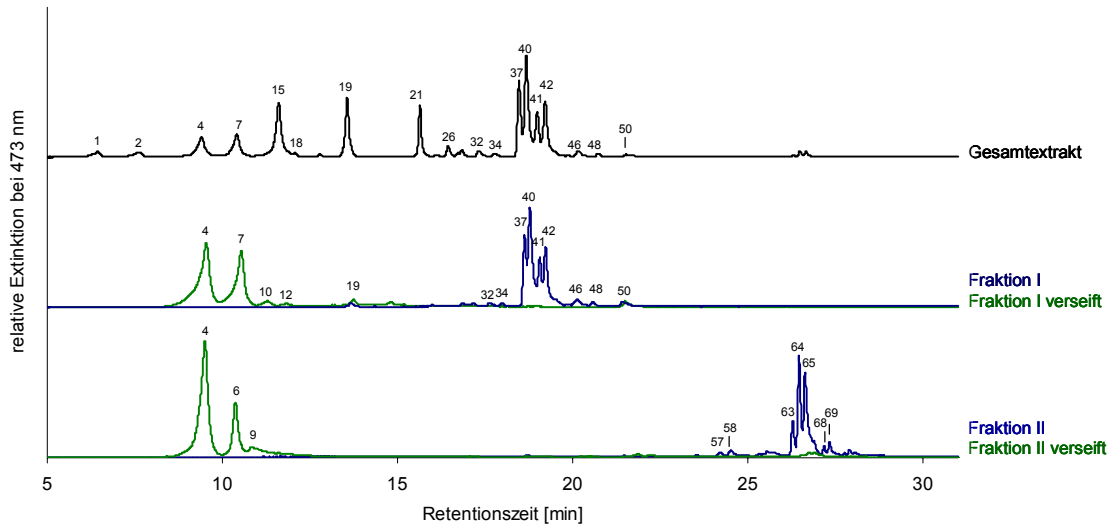
84) reduziert. Aus Astaxanthin (4) entstand Crustaxanthin (80 / 81), aus Canthaxanthin (19) Isozeaxanthin (86).



**Abb. 25** HPLC-Chromatogramm von Pigmentextrakt aus reifen Aplanosporen der Grünalge *M. zofingiensis* (schwarz), dem verseiften Pigmentextrakt (blau) und dem verseiften sowie anschließend mit  $\text{NaBH}_4$  reduziertem Pigmentextrakt (grün). Neoxanthin (1), Violaxanthin (2), Lutein (15), Chlorophyll b (21), Chlorophyll a (26) und  $\beta$ -Carotin (50) sind Pigmente, die auch in vegetativen Zellen zu finden waren. Astaxanthin (4), 4-Ketolutein (7), Canthaxanthin (19) und Echinenon (27) stellen die freien Ketocarotinoide dar. Die Pigmente 32-42 stellen die Ketocarotinoidmonoacyl ester und die Pigmente 57-69 die Ketocarotinoiddiacyl ester dar. Die wichtigsten neuen Pigmente in der reduzierten Probe wurden als Crustaxanthin (80, 81), cis-Crustaxanthin (82), 4-Hydroxylutein (83, 84) und Isozeaxanthin (86) vorläufig identifiziert. Zur Erstellung der Chromatogramme wurde die HPLC-Methode 2 verwendet.

### 3.1.4.9. Analyse der Pigmentzusammensetzung in den Ketocarotinoid-Mono- und – Diacylestern aus reifen Aplanosporen von *M. zofingiensis*

In den Chromatogrammen der Fraktionen mit den aufkonzentrierten Monoestern von 3 Monate alten Aplanosporen von *M. zofingiensis* (Abb. 26, Fraktion I) dominierten die Peaks 37 und 40, die ein Astaxanthin-Spektrum aufwiesen und 41 und 42, die ein 4-Ketolutein-Spektrum zeigten. Nach der Verseifung dieser Proben konnten Astaxanthin und 4-Ketolutein sowie geringe Mengen an Adonirubin nachgewiesen werden. Demnach bestanden die Pigmentanteile der Monoacyl ester aus Astaxanthin und 4-Ketolutein sowie aus Adonirubin. In den aufkonzentrierten Diestern dominierten die Peaks 63, 64 und 65 (Abb. 26, Fraktion II). Diese wiesen ein Astaxanthin-Spektrum auf. Durch die Hydrolyse der Diacyl ester wurden hauptsächlich Astaxanthin, sowie geringe Mengen an Adonirubin frei.



**Abb. 26** Chromatogramme von fraktionierten und verseiften Pigmentextrakten aus 3 Monate alten Aplanosporen von *M. zofingiensis*. Das Chromatogramm des Gesamtextraktes ist in Schwarz dargestellt. In der Mitte sind die Fraktion der Monoacyl ester in Blau und in Grün das Ergebnis ihrer Verseifung dargestellt. Im unteren Drittel sind die Fraktion II (blau) und ihr Verseifungsprodukt (grün) gezeigt. Durch die Hydrolysereaktion erhöht sich der Anteil der freien Ketocarotinoide Astaxanthin (4), *cis*-Astaxanthin (6) und 4-Ketolutein (7) bzw. *cis*-4-Ketolutein (10). Eine detaillierte Zuordnung der Peaknummern zu ihren Pigmentnamen ist in der Tabelle 1 aufgeführt. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 2 erstellt.

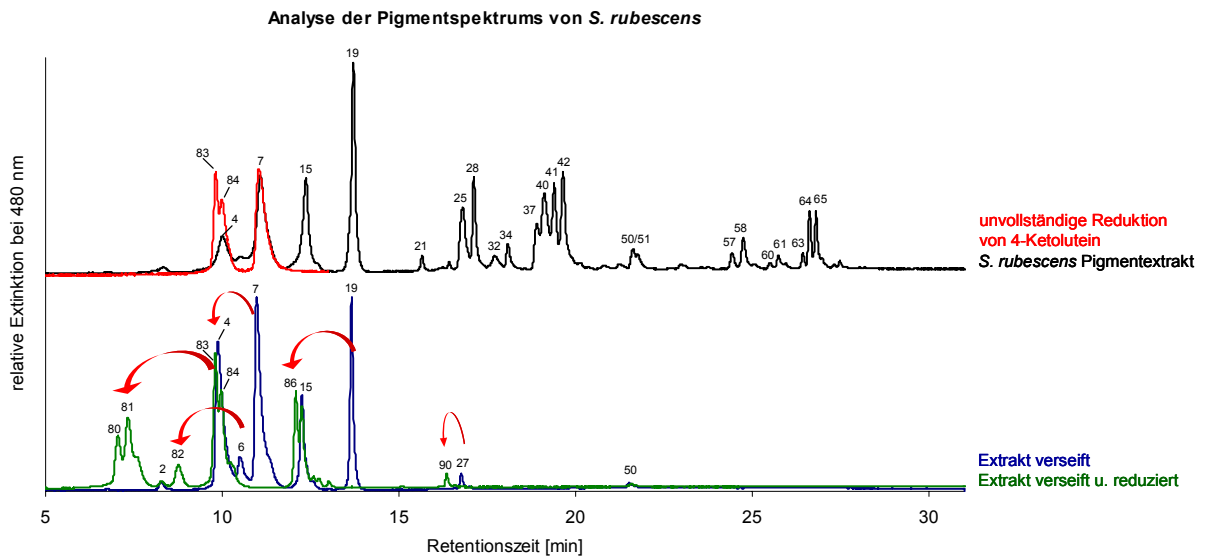
### 3.1.4.10. Analyse der Pigmentzusammensetzung in reifen Aplanosporen von *S. rubescens*

Im Extrakt aus 3 Monate alten Dauerstadien von *S. rubescens* wurden, wie in den reifen Zygosporen von *C. reinhardtii*, die freien Ketocarotinoide Astaxanthin (4), 4-Ketolutein (7) und Canthaxanthin (15) identifiziert. Eine geringe Menge an Echinenon (27) wurde ebenfalls detektiert. Es coeluierte mit Peak 25 und war daher erst im verseiften Chromatogramm gut sichtbar (Abb. 27).

Im Produkt der Verseifungsreaktion tauchten keine Mono- und Diacyl esterpeaks mehr auf. Die Menge an Astaxanthin und 4-Ketolutein erhöhte sich relativ zu den Pigmenten Violaxanthin, Lutein, Canthaxanthin und  $\beta$ -Carotin, deren Stöchiometrien zueinander unverändert blieben. Folglich müssen die Chromophore der Acyl ester aus Astaxanthin und 4-Ketolutein bestanden haben.

Die Reduktion des verseiften Extraktes mit Natriumborhydrid bestätigte auch hier wieder die Identität der Ketocarotinoide. Die Peaks mit einer Ketogruppe wiesen eine weniger verkürzte Retentionszeit auf, als die mit zwei Ketogruppen. Zur Verdeutlichung, dass aus 4-Ketolutein (7) in der Reduktion 4-Hydroxylutein (83 / 84) entsteht, wurde das Chromatogramm der

unvollständigen Reduktion von 4-Ketolutein in Abb. 27 noch einmal mit aufgeführt. Aus Astaxanthin (4) entstand Crustaxanthin (80 / 81), aus Canthaxanthin (19) Isozeaxanthin (86) und aus Echinenon (27) 4-Hydroxy- $\beta$ -carotin (90). Auch wurden die Pigmente Violaxanthin (2), Lutein (15),  $\beta$ -Carotin (50), die keine Ketogruppe tragen, durch die Zugabe von Natriumborhydrid nicht verändert.

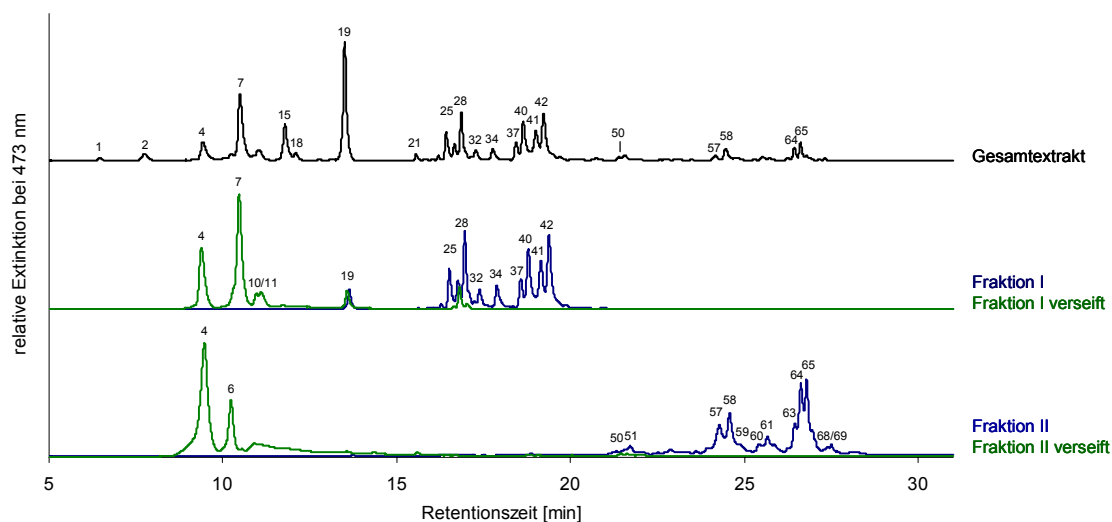


**Abb. 27** HPLC-Chromatogramm von Pigmentextrakt aus reifen Aplanosporen der Grünalge *S. rubescens* (schwarz), dem verseiften Pigmentextrakt (blau) und dem verseiften und anschließend mit  $\text{NaBH}_4$  reduziertem Pigmentextrakt (grün). Die rote Kurve zeigt das HPLC-Chromatogramm der unvollständigen Reduktion von 4-Ketolutein. Violaxanthin (2) Lutein (15), Chlorophyll b (21), und  $\beta$ -Carotin (50) waren auch in vegetativen Zellen zu finden. Astaxanthin (4), 4-Ketolutein (7) Canthaxanthin (19) und Echinenon (27) sind die freien Ketocarotinoide. Die Pigmente 25-42 sind die Ketocarotinoidmonoacylster und die Pigmente 57-65 die Ketocarotinoiddiacylster. Im Reaktionsprodukt der verseiften und reduzierten Probe, konnten die Pigment 4-Hydroxy- $\beta$ -carotin (90), Crustaxanthin (80, 81), cis-Crustaxanthin (82), 4-Hydroxylutein (83, 84) und Isozeaxanthin (86) identifiziert werden. Zur Erstellung der Chromatogramme wurde die HPLC-Methode 2 verwendet.

### 3.1.4.11. Analyse der Pigmentzusammensetzung in den Ketocarotinoid-Mono- und – Diacylestern aus reifen Aplanosporen von *S. rubescens*

Bei Verseifung der aufkonzentrierten Monoacylsterfraktion unter Sauerstoffausschluss bei milden basischen Bedingungen (Abb. 28) gingen die freien Pigmente Astaxanthin, 4-Ketolutein inkl. *cis*-4-Ketolutein so wie eine geringe Menge an Adonirubin hervor. Die Pigmente Canthaxanthin (19) und Echinenon (27) lagen auch in der unverseiften Probe in gleicher Stöchiometrie zueinander vor. Die Pigmentanteile in den Monoacylestern bestanden folglich aus den Pigmenten Astaxanthin, 4-Ketolutein und Adonirubin. 4-Ketolutein stellte dabei den größten Anteil dar.

Auch in den Diacylestern von *S. rubescens* wurde kein 4-Ketolutein nachgewiesen. Bei der Verseifung der Diacylsterfraktion wurden Astaxanthin, *cis*-Astaxanthin und Adonirubin frei (Abb. 28).



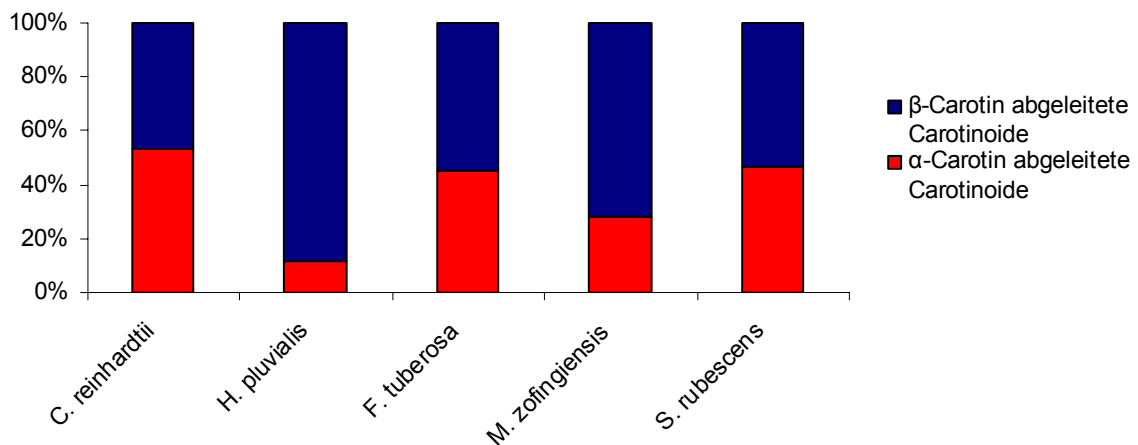
**Abb. 28** Chromatogramme von Pigmentextrakten aus 3 Monate alten Aplanosporen von *S. rubescens*. Das Chromatogramm des Gesamtextraktes ist in Schwarz dargestellt. In der Mitte sind die Fraktion der Monoacylster in Blau und in Grün das Ergebnis ihrer Verseifung dargestellt. Durch die Hydrolysereaktion erhöht sich der Anteil der freien Ketocarotinoide Astaxanthin (4) und 4-Ketolutein (7) bzw. *cis*-Astaxanthin (6) und *cis*-4-Ketolutein (10). Im unteren Drittel sind die Fraktion II (blau) und ihr Verseifungsprodukt (grün) gezeigt. Eine detaillierte Zuordnung der Peaknummern zu ihren Pigmentnamen ist in der Tabelle 1 aufgeführt. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 2 erstellt.

### 3.1.5. Vergleich der Carotinoidzusammensetzung in Dauerstadien verschiedener Grünalgenverteter

Im Folgenden werden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Pigmentzusammensetzung der unterschiedlichen Grünalgen dargestellt. Dabei wurde insbesondere das Verhältnis der von  $\alpha$ -Carotin abgeleiteten zu der von  $\beta$ -Carotin abgeleiteten Carotinoide betrachtet. Die Daten für die Ermittlung der Gesamtzusammensetzung der Ketocarotinoide in den Dauerstadien wurden aus Verseifungsexperimenten des Gesamtextraktes generiert. Grund dafür war eine erschwerte Quantifizierung, da viele Pigmente in den komplexen Proben der Dauerstadien von Grünalgen coeluierten. *Cis*- und *trans*-Isomere eines Pigments wurden in den folgenden Übersichten zusammengefasst und nicht gesondert aufgeführt, da sich die Stöchiometrie zwischen *cis*- und *all-trans*-Carotinoiden unter basischen Bedingungen ändern kann (Zechmeister, 1962).

Der Vergleich der Pigmentzusammensetzung verschiedener Grünalgenvertreter zeigte, dass der Anteil der vom  $\alpha$ -Carotin abgeleiteten Carotinoide in den Dauerstadien bis zu 53% der Gesamtcarotinoide darstellen kann. Das war bei *C. reinhardtii* der Fall (Abb. 29). Zu den  $\alpha$ -Carotin abgeleiteten Pigmenten zählen 4-Ketolutein und Lutein. Zu den  $\beta$ -Carotin abgeleiteten Pigmenten gehören Neoxanthin, Violaxanthin, Astaxanthin, Adonirubin, Canthaxanthin, Echinenon und  $\beta$ -Carotin.

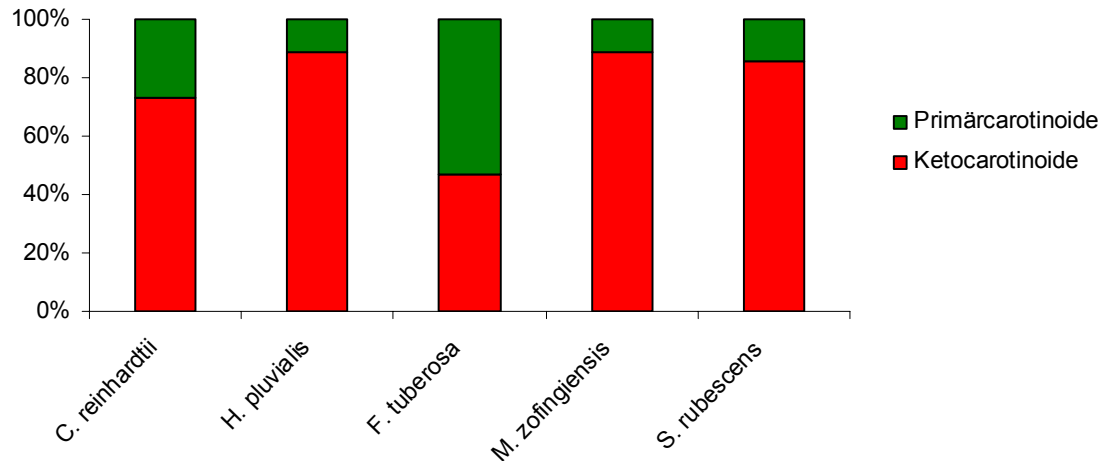
Unter den hier untersuchten Grünalgen wies *H. pluvialis* mit einem Zehntel  $\alpha$ -Carotin abgeleiteter Pigmente den geringsten Anteil an dieser Carotinoidspezies auf. Die weiteren Algen bewegen sich zwischen diesen beiden Extremen.



**Abb. 29** Zusammensetzung der Carotinoide in Dauerstadien ausgewählter Grünalgen. In Blau unter dem Namen  $\beta$ -Carotinoide sind alle Carotinoide zusammengefasst die sich vom  $\beta$ -Carotin ableiten, wie Neoxanthin, Violaxanthin,  $\beta$ -Carotin, Echinenon, Canthaxanthin, Adonirubin, Astaxanthin, so wie

*Astaxanthin- und Adonirubinacylester. Unter  $\alpha$ -Carotin abgeleitete Carotinoide verstehen sich die Carotinoide Lutein, 4-Ketolutein und 4-Ketoluteinmonoacylester.*

Der gemessene Anteil der Ketocarotinoide in den Dauerstadien der Grünalgen stellte mindestens 47% des Gesamtcarotinoidgehaltes dar (Abb. 30), in *H. pluvialis* sogar 89%.



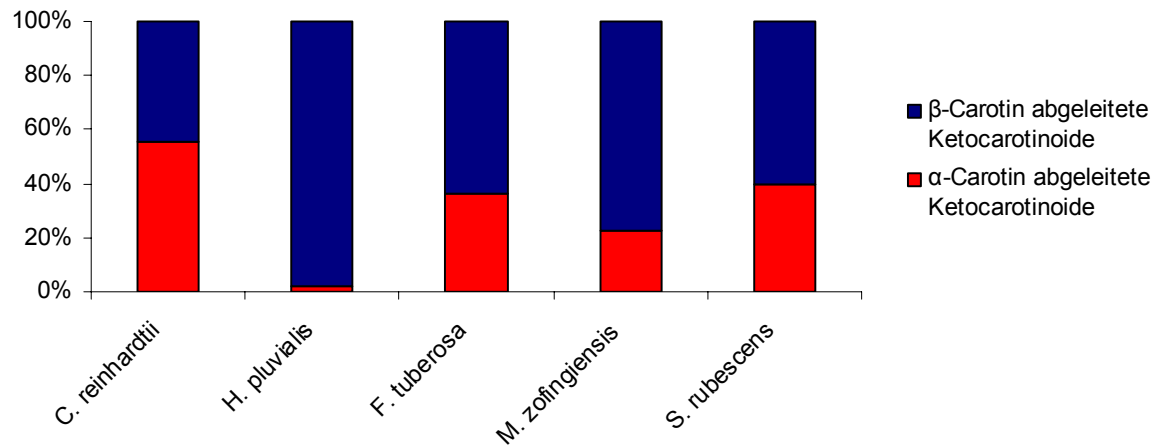
**Abb. 30** Anteil der Ketocarotinoide am Gesamtcarotinoidgehalt in Dauerstadien ausgewählter Grünalgen. In Grün sind die Primärcarotinoide dargestellt. In Rot sind die Ketocarotinoide aufgeführt.

Die Ketocarotinoide können ebenfalls in  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Carotin abgeleitete Pigmente aufgeteilt werden. Die Gruppe der von  $\alpha$ -Carotin abgeleiteten besteht dabei ausschließlich aus 4-Ketolutein, die von  $\beta$ -Carotin abgeleiteten aus Astaxanthin, Canthaxanthin, Adonirubin und Echinenon. Unter den Ketocarotinoiden war der größte Anteil an  $\alpha$ -Carotin abgeleiteten Molekülen wieder in den reifen Zygosporen von *C. reinhardtii* zu finden. Er lag bei 55% (Abb. 31). *H. pluvialis* wies zu 98%  $\beta$ -Carotin abgeleitete Ketocarotinoide auf. Alle anderen Algen bewegten sich mit ihrer Pigmentzusammensetzung zwischen diesen beiden Extremen.

Die Mengenverhältnisse, die in verseiften Proben und nachgeschalteter Reduktion ermittelt wurden, entsprachen denen der verseiften Proben.

## ERGEBNISSE

---



**Abb. 31** Zusammensetzung des Ketocarotinoidanteils in Dauerstadien ausgewählter Grünalgen. In Blau sind die vom  $\beta$ -Carotin abgeleiteten Ketocarotinoide dargestellt, in Rot sind die Ketocarotinoide aufgeführt, die sich vom  $\alpha$ -Carotin ableiten.

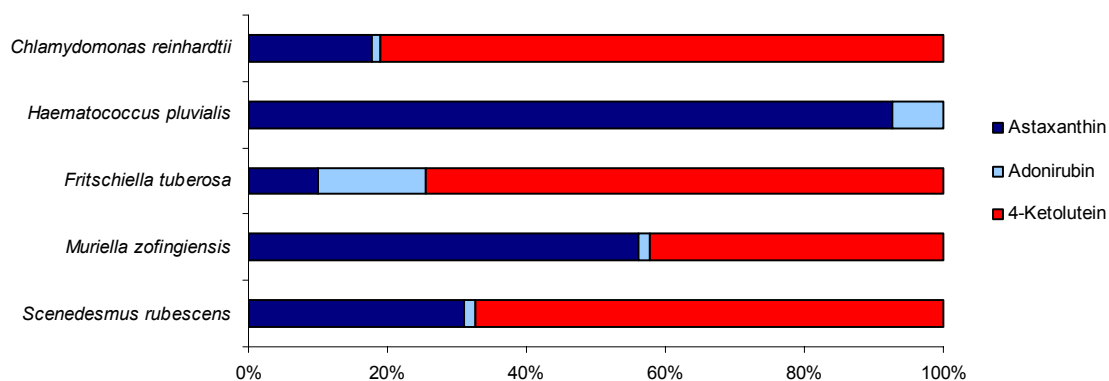


### 3.1.6. Vergleich der Pigmentzusammensetzung in den Mono- und Diacylestern aus Dauerstadien unterschiedlicher Grünalgen

Aus den Verseifungsexperimenten der Fraktion I und Fraktion II konnte eine Quantifizierung der Pigmentanteile vorgenommen werden, von der aus auf die Zusammensetzung der Pigmentanteile in den Mono- bzw. Diacylester geschlossen werden konnte. Durch die Fraktionierung konnten die Pigmentstöchiometrien die im Gesamtextrakt vorherrschten jedoch nicht zu 100% genau abgebildet werden. Es war damit zu rechnen, dass die Pigmente am Rande der Fraktionsgrenzen gegenüber den Pigmenten in der Fraktionsmitte einen etwas geringeren Anteil als im Gesamtextrakt aufwiesen. Trotz dieses Fehlers gaben die Daten einen guten Eindruck von der Zusammensetzung und werden im Folgenden aufgeführt.

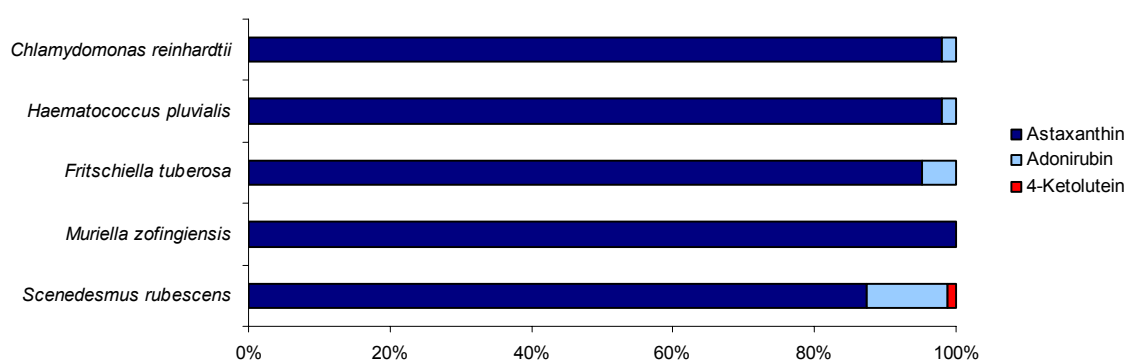
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Pigmentanteile der Monoacylester aus den drei Pigmenten Astaxanthin, Adonirubin und 4-Ketolutein bestehen können (Abb. 32).

*H. pluvialis* oblag auch bei der Zusammensetzung der Pigmentanteile der Monoacylester wieder eine Sonderrolle. Im Unterschied zu den anderen Algen bestand dieser Pigmentanteil fast nur aus Astaxanthin und Adonirubin. Die Menge an 4-Ketolutein war in *H. pluvialis* sehr gering und coeluierte zudem mit Adonirubin im HPLC-Lauf, so dass eine Bestimmung des 4-Ketoluteingehalts nicht möglich war. Die übrigen Algen wiesen Gehalte von 4/10 bis 8/10 an 4-Ketolutein als Pigmentanteil in den Monoacylestern auf (Abb. 32).



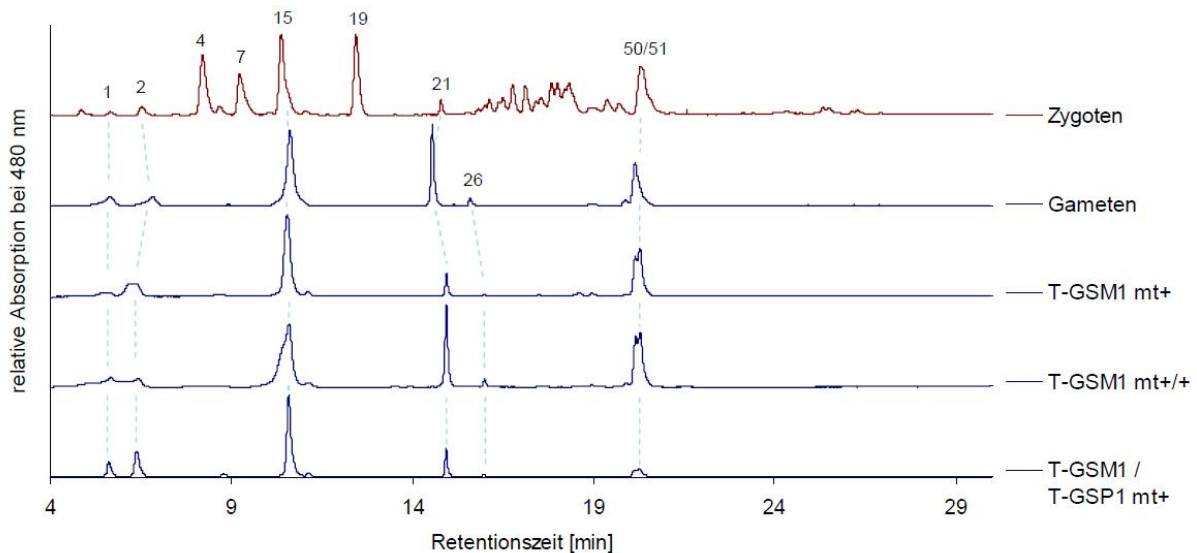
**Abb. 32** Ergebnisse der Verseifungsexperimente aus fraktionierten Pigmentextrakten der 3 Monate alten Grünalgen-Dauerstadien in der Übersicht. Im Diagramm wurde die Zusammensetzung der Pigmentanteile dargestellt, die sich durch die Verseifung der jeweiligen Fraktionen I ergaben. Aus den Daten kann ein Rückschluss auf die Pigmentzusammensetzung in den Monoacylestern gezogen werden.

Im Gegensatz dazu stehen die Diacyl ester, in denen kein 4-Ketolutein nachgewiesen werden konnte (Abb. 33). Die Pigmentanteile der Diacyl ester bestanden ausschließlich aus Astaxanthin. Das Molekül Adonirubin kann nur in monoacylierter Form auftreten, da es nur eine Hydroxygruppe für die Veresterung mit den Fettsäuren aufweist. In allen Fraktionen II, mit Ausnahme der von *M. zofingiensis*, kamen zusätzlich auch Adonirubinmonoester vor. Möglicherweise haben die Adonirubinacyl ester eine Retentionszeit nahe des  $\beta$ -Carotins, ähnlich wie der Peak 52 von 4-Ketolutein und waren damit besonders schwer von der Fraktion I abzutrennen.



**Abb. 33** Ergebnisse der Verseifungsexperimente aus fraktionierten Pigmentextrakten der 3 Monate alten Grünalgen-Dauerstadien in der Übersicht. Im Diagramm wurde die Zusammensetzung der Pigmentanteile dargestellt, die sich durch die Verseifung der Fraktionen II ergaben. Aus den Daten kann ein Rückschluss auf die Pigmentzusammensetzung in den Diacyl estern gezogen werden.

### 3.2. Regulation der Ketocarotinoidbiosynthese in Zygosporen von *C. reinhardtii*



**Abb. 34** Vergleich der Pigmentzusammensetzung von *C. reinhardtii* Zygosporen und Gameten, sowie mit Kulturen bei denen das Zygotenprogramm durch Expression von GSM1 bzw. GSP1 aktiviert wurde. In rot ist das Chromatogramm von Pigmentextrakt aus 4 Wochen alten reifen *C. reinhardtii* Zygoten (cc620/cc621) dargestellt. Bei den Pigmenten 4 (Astaxanthin), 7 (4-Ketolutein) und 19 (Canthaxanthin) handelt es sich um die freien Ketocarotinoide. Die Ketocarotinoidmonoacyl ester weisen Retentionszeiten auf, die zwischen denen der Moleküle Chlorophyll b (21) und  $\beta$ -Carotin (50/51) liegen. Ketocarotinoiddiacyl ester eluieren später als  $\beta$ -Carotin (50). Darunter zum Vergleich das Chromatogramm von Pigmentextrakt aus einem Tag alten Gameten von *C. reinhardtii* (cc620). Die unteren drei Diagramme wurden aus Pigmentextrakten von vier Wochen alten Mutantenkulturen erstellt. Die Kulturen wurden unter den gleichen Bedingungen angezogen und behandelt, die zur Gameteninduktion, Paarung und der Zygotenreifung von Wildtypstämmen verwendet wurden. Konstrukt T-GSM1\_mt+/mt+ ist eine diploide vegetative Zelllinie von *C. reinhardtii*, die unter Stickstoffmangel ein Zygotenprogramm initiiert, ohne dass eine Paarung notwendig ist. Die Mutante T-GSM1/T-GSP1\_mt+ ist eine haploide Zelllinie, die konstitutiv GSP1 und GSM1 exprimiert und so ein Zygotenprogramm ablaufen lässt. Der dritte getestete Vertreter ist die Mutante T-GSM1\_mt+, haploide Zellen, die unter Stickstoffmangel Zygosporprogrammaktivität zeigen. Die Mutanten wurden in Zhao 2001 und Lee 2008 charakterisiert.

Um mögliche molekulare Regulationsfaktoren aufzuklären die zur Induktion der Ketocarotinoidproduktion führen, wurden die Pigmentzusammensetzung von *C. reinhardtii*-Zellen mit aktiviertem Zygotenprogramm (Zhao 2001, Lee 2008) untersucht. Die Mutanten wurden von Jae-Hyeok Lee für die Experimente zur Verfügung gestellt. Zum Startzeitpunkt entsprach die Pigmentzusammensetzung der Mutanten dem von WT-Gameten. Für die

Mutanten wurden die gleichen Bedingungen simuliert, die bei der Paarung der Zygoten und der anschließenden Reifung der Zygoten verwendet wurden, unter denen die Ketocarotinoide synthetisiert werden. In der Abb. 34 dargestellt ist die Pigmentzusammensetzung von drei Mutanten mit aktiviertem Zygotenprogramm nach vierwöchiger Inkubation auf TAP-Agar ohne Stickstoffquelle. In den Mutanten konnten keine freien Ketocarotinoide detektiert werden (Abb. 34). Im Bereich der Retentionszeiten von 16 – 21 Minuten und 21 bis 28 Minuten, in dem bei den konventionellen Zygoten aus der Kreuzung der Stämme cc620 und cc621 die Ketocarotinoidmonoacylester- und Ketocarotinoiddiacylester Peaks dominieren, sind keine entsprechenden Peaks in den Mutanten zu finden (Abb. 34). Die schwachen Signale die im Bereich von 16-21 Minuten auftraten, findet man auch in Wildtypgameten, die unter entsprechenden Bedingungen für 4-Wochen inkubiert wurden. Das Phänomen wurde von Werner (2011) im Rahmen ihrer Doktorarbeit untersucht (Daten unveröffentlicht). Sie vermutet, dass es sich um Luteinester handelt. Alle diese Peaks in der hier vorliegenden Untersuchung weisen ein dreigipfliges Spektrum im UV/VIS-Bereich auf, also kein Ketocarotinoidspektrum. In den Mutanten konnten in der HPLC-Analyse weder Spuren freier Ketocarotinoide, noch Ketocarotinoidacylester gefunden werden.

### **3.3. Charakterisierung von Schlüsselenzymen der Carotinoidbiosynthese in *C. reinhardtii***

Eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit lag darin, die an der Ketocarotinoidbiosynthese in *C. reinhardtii* beteiligten Enzyme zu charakterisieren. Dabei sollte die Frage geklärt werden, in welcher Reihenfolge die Hydroxylasen und die Ketolase arbeiten, um Astaxanthin zu synthetisieren. Daneben sollte untersucht werden, ob die  $\beta$ -Carotin-Ketolase (BKT) aus *C. reinhardtii* tatsächlich auch  $\alpha$ -Carotin und davon abgeleitete Xanthophylle ketolieren kann, und damit für die Synthese von 4-Ketolutein in den Dauerstadien der Algen verantwortlich ist.

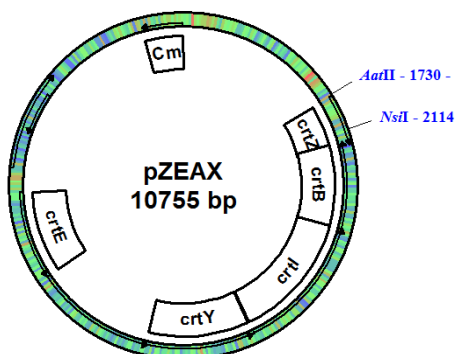
#### **3.3.1. Erweiterung des Substratportfolios durch die Herstellung neuer carotinoidproduzierender Bakterienstämme als Voraussetzung für die Charakterisierung der Enzyme aus *C. reinhardtii***

Da uns für das Schlüsselenzym BKT aus *C. reinhardtii* die Etablierung eines *in vitro*-Assays nicht gelang, sollte die BKT in carotinogenen Bakterien getestet werden. In der Carotinoidbiosyntheseforschung werden Bakteriensysteme häufig verwendet um Gene unbekannter Funktion zu testen. Hierbei werden *E. coli*-Zellen durch konstitutiv aktive Gene auf einem Plasmid dazu gebracht, die Carotinoide zu produzieren, die als Substrat für den Enzymtest benötigt werden. Das funktionell zu charakterisierende Gen wird auf einem zweiten Vektor in diesen Zellen exprimiert. Dieses Verfahren fand auch in der hier vorliegenden Arbeit Anwendung. Durch AG von Lintig (Universität Freiburg) stand uns der Vektor pACCAR25 $\Delta$ crtZ (Misawa, 1995) zur Verfügung, der in der vorliegenden Arbeit als pZEAX bezeichnet wird (Abb. 53). Die Transformation von *E. coli*-Zellen mit pZEAX resultiert in einem Zeaxanthin produzierenden Bakterienstamm. Für eine umfassende funktionelle Charakterisierung der BKT und der Carotinoidhydroxylasen aus *C. reinhardtii* waren jedoch Bakterienstämme notwendig, die weitere Carotinoide als Substrate zur Verfügung stellen. In meiner Arbeit habe ich dafür carotinogene Bakterienstämme zur Produktion von Lycopin,  $\beta$ -Carotin, Rubixanthin,  $\alpha$ -Carotin, Lutein,  $\gamma$ -Carotin und Canthaxanthin hergestellt. Die beiden letztgenannten Stämme wurden durch Praktikumsstudenten unter meiner Anleitung hergestellt. Grundlage für die Herstellung der Stämme bildete das Plasmid pACCAR25 $\Delta$ crtX (Misawa, 1995). pACCAR25 $\Delta$ crtX und die von mir daraus hergestellten weiteren Plasmide wurden in DH5 $\alpha$ , XL1-Blue und Top10-Zellen transformiert. Alle drei Stämme zeigten sich als geeignet für die Versuche. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Carotinoidzusammensetzung dieser *E. coli*-Stämme beobachtet werden.

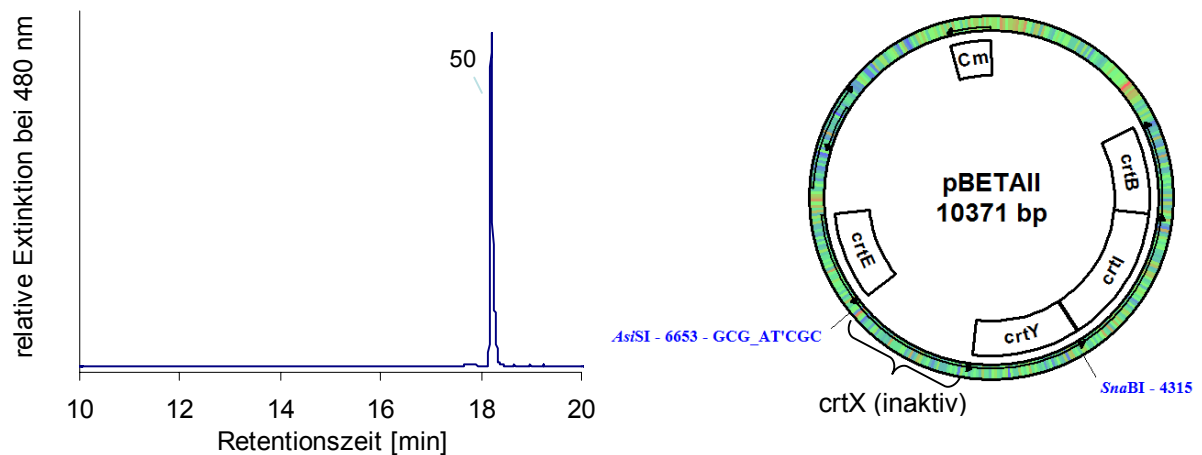
### 3.3.1.1. Herstellung eines $\beta$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes

Zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit erhielten wir von der AG von Lintig (Universität Freiburg) neben dem Plasmid pACCAR25 $\Delta$ crtX (Misawa, 1995) zwei weitere Plasmide für die Produktion von  $\beta$ -Carotin und Lycopin. Im Laufe der Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass diese beiden Plasmide falsch deklariert worden waren und für zusätzliche Enzyme kodierten, welche die Produkte der von mir zu testenden Enzyme weiter umwandelten. Daher wurde es notwendig, neue Plasmide für die Produktion von  $\beta$ -Carotin bzw. Lycopin herzustellen, da der Bezug geeigneter Plasmide von anderen Arbeitsgruppen nicht kurzfristig möglich war.

Aus dem Plasmid pZEAX wurde über einen Verdau mit den Restriktionsenzymen AatII und NsiI die bakterielle  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase crtZ entfernt. Die Überhänge wurden mittels der Phusion-Polymerase aufgefüllt, anschließend phosphoryliert und der Vektor religiert. Die positiven Klone wurden mit Hilfe einer Kolonie-PCR mit den Primern pACCAR25\_1632\_p und pACCAR16\_1768\_m vorselektiert und anschließend per Sequenzierung verifiziert. Der Pigmenttest bestätigte, dass der neue Vektor pBETA II transformierte DH5 $\alpha$ -Zellen veranlasst das Pigment  $\beta$ -Carotin zu produzieren (Abb. 36). Nebenprodukte im Pigmentextrakt wurden nicht detektiert.



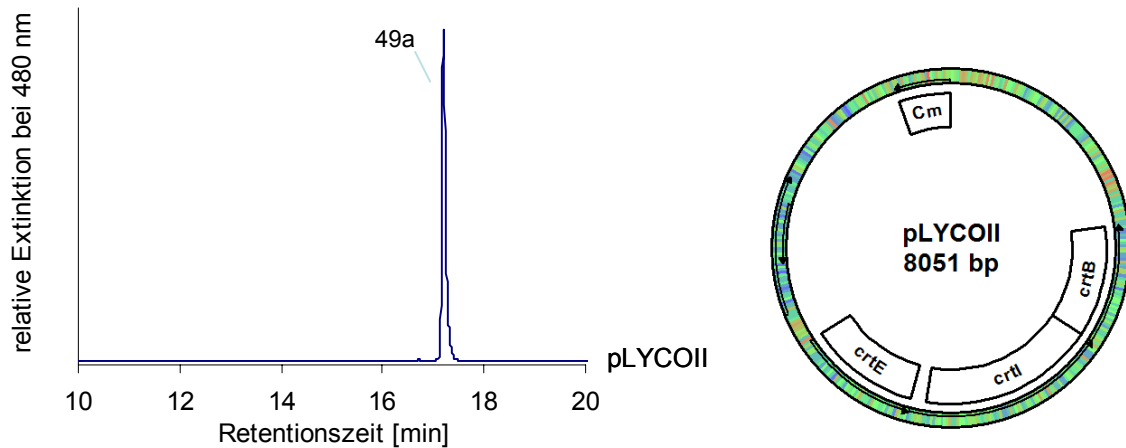
**Abb. 35** Aufbau des Plasmids pZEAX (pACCAR25 $\Delta$ crtZ; Misawa, 1995) und die Lage der Restriktionsschnittstellen AatII und Ssi (blau). Das Plasmid war mit Genen aus dem Bakterium *E. uredovora* ausgestattet (crtE, crtY, crtI, crtB, crtZ), die für die Carotinoidbiosynthese von Farnesylpyrophosphat zu Zeaxanthin codierten sowie einem Chloramphenicol-Resistenzgen (Cm).



**Abb. 36** HPLC-Chromatogramm eines Pigmentextraktes aus DH5 $\alpha$ -Zellen mit dem konstitutiv aktiven Plasmid pBETA II, das bakterielle Gene zur Synthese von  $\beta$ -Carotin (50) trug. Ein Überblick über den Aufbau des Plasmids und die Lage der Restriktionsschnittstellen *AsiSI* und *SnaBI* (blau) zeigt das Plasmidschema. Das Plasmid war mit einem Gencluster für die Carotinoidbiosynthese aus dem Bakterium *E. uredovora* ausgestattet, das die Enzyme *crtE*, *crtY*, *crtI* und *crtB* umfasste sowie mit einem Chloramphenicol-Resistenzgen (*Cm*). Zwischen den Genen *crtE* und *crtY* befand sich ein weiteres nicht aktives Gen, die *crtX*. Das Chromatogramm wurde mit der HPLC-Methode 1 erstellt.

### Herstellung eines Lycopin produzierenden Bakterienstammes

Ausgehend von dem Plasmid pBETA II wurde ein Plasmid zur Produktion von Lycopin hergestellt. Dazu wurden die Lycopinzyklase *crtY* und das inaktive Gen *crtX* durch Restriktionsverdau mit *AsiI* und *SnaBI* entfernt (Abb. 36). Anschließend wurden die Überhänge mittels eines Ansatzes aus Puffer, Phusion-Polymerase und dNTPs gebuntet, das Produkt phosphoryliert und der Vektor religiert. Die Vorauswahl der positiven Klone erfolgte durch optische Selektion auf eine rote Farbe der Kolonien. Dies war möglich, da das Template pBETA II die *E. coli*-Kolonien zur Produktion von orangem  $\beta$ -Carotin anregt, das neue Plasmid aber zur Produktion von rotem Lycopin. Die Selektion wurde durch Sequenzierung verifiziert. In der HPLC-Analyse des Pigmentextraktes aus DH5 $\alpha$ -Zellen mit dem neuen Plasmid pLYCO II wurde Lycopin identifiziert (Abb. 37). Nebenprodukte im Pigmentextrakt wurden auch hier nicht detektiert.



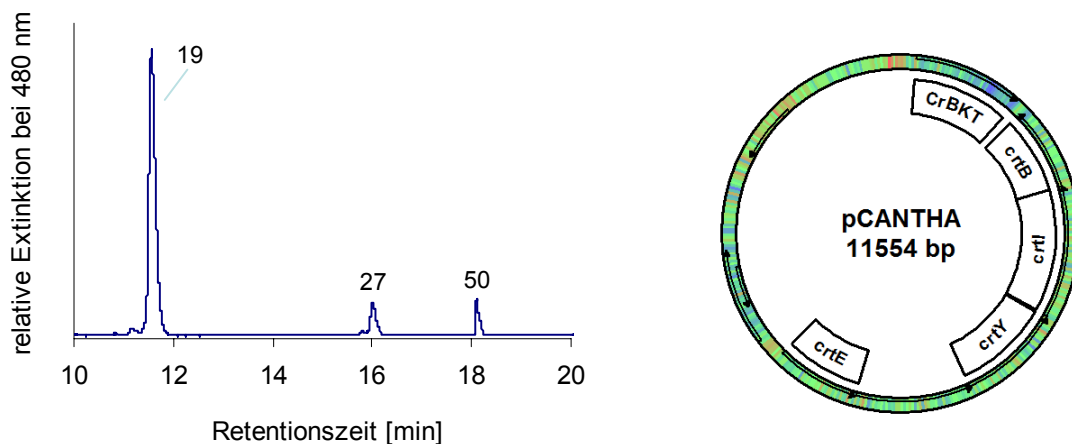
**Abb. 37** HPLC-Chromatogramm eines Pigmentextraktes aus DH5 $\alpha$ -Zellen mit dem konstitutiv aktiven Plasmid pLYCO II, das bakterielle Gene zur Synthese von Lycopin (49a) trug. Das Plasmid war mit den Genen *crtE*, *crtI* und *crtB* für die Carotinoidbiosynthese aus dem Bakterium *E. uredovora* ausgestattet, sowie mit einem Chloramphenicol-Resistenzgen (*Cm*). Das Chromatogramm wurde mit der HPLC-Methode 1 erstellt.

### 3.3.1.2. Herstellung eines Canthaxanthin produzierenden Bakterienstammes

Um untersuchen zu können, ob die CHYB, eine der Carotinoidhydroxylasen aus *C. reinhardtii*, auch in der Lage ist ketolierte Substrate zu hydroxylieren, wurde die Herstellung eines Canthaxanthin produzierenden Bakterienstammes notwendig. Die Klonierungsarbeiten dazu wurden im Rahmen eines Laborpraktikums von Jürgen Kopp und Simon Gehring unter meiner Anleitung durchgeführt. Das Konstrukt basiert auf dem pACCAR25 $\Delta$ crtX-Vektor (Misawa et al. 1995). In dem Plasmid wurde das bakterielle  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase-Gen *crtZ* durch das BKT-Gen aus *C. reinhardtii* ersetzt. Dazu wurde zunächst *crtZ* aus dem Vektor durch Restriktion mit den Enzymen AatII und NsiI entfernt (Abb. 35). Die Restriktionsschnittstelle für AatII lag 20 Basen stromaufwärts vom Startcodon des *crtZ*-Gens. Dadurch wurde die Ribosomenbindestelle mit der Sequenz „ACCGGAGAA“ (Misawa et al. 1990) beim Ausschneiden des Gens mit entfernt. Dem einzubringenden BKT-Gen wurde durch PCR die AatII-Schnittstelle inklusive der Ribosomenbindestellensequenz und des Startcodons am 5' Ende mit dem Primer CrBKTP-AatII angefügt. Am 3' Ende wurde über den Primer CrBKTM1-SbfI die Schnittstelle für SbfI angefügt, das den gleichen Überhang produziert wie NsiI. Das PCR-Produkt wurde in pGEM T-Easy-Vektor zwischenkloniert, die BKT-Gensequenz durch Doppelverdau mit AatII und SbfI ausgeschnitten und in den offenen, dephosphorylierten pACCAR25 $\Delta$ crtX -Vektor kloniert. Das resultierende Produkt, der Vektor pCANTHA, wurde in DH5 $\alpha$ - und Top10-Zellen getestet. Im Pigmentextrakt wurde in der HPLC-Analyse als Hauptpigment mit einem Anteil



von mehr als 80% des Gesamtpigmentgehalts Canthaxanthin detektiert (Abb. 38). Die Identifikation erfolgte mittels Referenzpigment. Als Nebenprodukte wurden die Zwischenprodukte  $\beta$ -Carotin und Echinenon identifiziert.



**Abb. 38** HPLC-Chromatogramm eines Pigmentextraktes aus DH5 $\alpha$ -Zellen mit dem konstitutiv aktiven Plasmid pCANTHA, das bakterielle Gene zur Synthese von  $\beta$ -Carotin sowie das BKT-Gen aus *C. reinhardtii* zur Synthese von Canthaxanthin (19) trägt. Als Nebenprodukte wurden Echinenon (27) und  $\beta$ -Carotin detektiert. Einen Überblick über den Aufbau des Plasmids gibt das Schema. Das Chromatogramm wurde mit der HPLC-Methode 1 erstellt.

### 3.3.1.3. Herstellung eines $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes

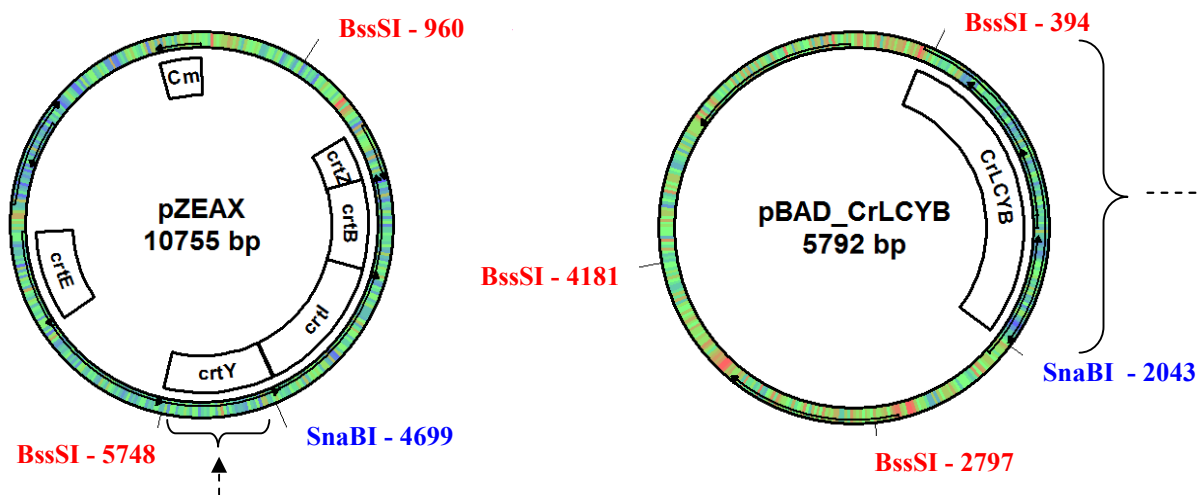
Für die Biosynthese von  $\alpha$ -Carotin sind ausgehend vom Lycopin zwei Enzyme notwendig: Eine Lycopin- $\beta$ -Zyklase und eine Lycopin- $\epsilon$ -Zyklase. Bisher wurde noch von keiner Arbeitsgruppe über die Herstellung eines  $\alpha$ -Carotin produzierenden *E. coli*-Stamm berichtet, der für die funktionelle Charakterisierung von Enzymen geeignet wäre, die  $\alpha$ -Carotin als Substrat verwenden. Zwar gelang es Cunningham und Gantt (1997; 2005)  $\alpha$ -Carotin in *E. coli* zu synthetisieren, jedoch waren dazu zwei Plasmide notwendig. Mit dem System von Cunningham und Gantt können damit nicht ohne weiteres Charakterisierungen neuer Enzyme durchgeführt werden. Um die BKT aus *C. reinhardtii* zu testen, wurde die Herstellung eines  $\alpha$ -Carotin produzierenden *E. coli*-Stammes nötig, bei dem alle Gene für die Produktion des  $\alpha$ -Carotins auf einem Plasmid liegen.

Plew (2009) charakterisierte in ihrer Examensarbeit die Lycopin- $\epsilon$ -Zyklase (LCYE) aus *C. reinhardtii*. Bei der Expression des Gens in einem  $\beta$ -carotinogenen Bakterienstamm, der die bakterielle Lycopin- $\beta$ -Zyklase crtY enthielt, konnte sie nur minimale Mengen an  $\delta$ -Carotin und nahezu kein  $\alpha$ -Carotin detektieren. Da aus der Kombination der bakteriellen Lycopin- $\beta$ -Zyklase (crtY) und der algalen LCYE nur sehr geringe Mengen an  $\alpha$ -Carotin hervorgingen, erschien die direkte Klonierung der LCYE aus *C. reinhardtii* in den Vektor pBETA II zur

Herstellung eines  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes nicht als aussichtsreich. Daher wurde es zunächst notwendig, das bakterielle Lycopin- $\beta$ -Zyklase-Gen *crtY* im Vektor pBETA II durch das algale Lycopin- $\beta$ -Zyklase-Gen (LCYB) aus *C. reinhardtii* auszutauschen, was zu dem Zwischenschritt der Herstellung eines Rubixanthin und eines  $\gamma$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes führte.

### Zwischenschritt der Herstellung von Rubixanthin und $\gamma$ -Carotin produzierenden Bakterienstämmen

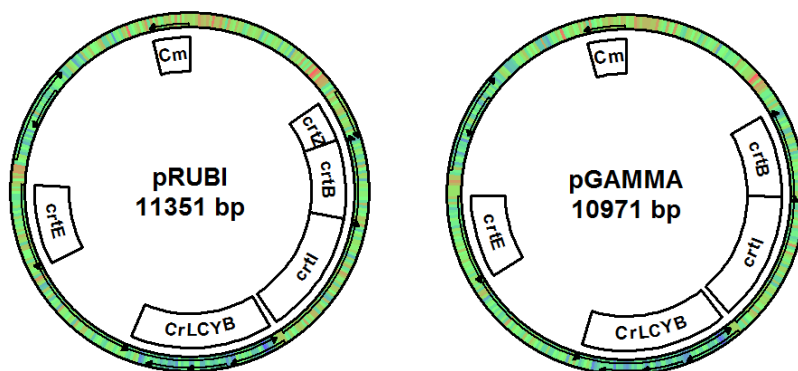
Die Lycopinzyklase  $\beta$  (LCYB) aus *C. reinhardtii* war zu diesem Zeitpunkt noch nicht funktionell charakterisiert. Im Rahmen eines von mir betreuten Laborpraktikums von Sonja Faust und Yvonne Pörschke wurde das LCYB-Gen von *C. reinhardtii* zunächst mit den Primern LCYBpACCAR a1p und LCYBpACCAR e1m aus dem Plasmid AV641959 (Lohr et al. 2005) amplifiziert und in den pBAD-TOPO-TA-Expressionsvektor kloniert. Die Primer waren so konstruiert, dass sie dem Produkt die Schnittstellen für *Sna*BI am 5'-Ende und für *Bss*SI am 3'-Ende anfügten. Die Orientierung wurde per Kolonie-PCR mit den Primern LCYB Seq und pBAD Vektor e1m überprüft und der korrekte Einbau durch Sequenzierung verifiziert. Der Test des Konstruktes pBAD\_LCYB wurde in lycopinogenen DH5 $\alpha$ -Zellen durchgeführt. Bei der Induktion über Nacht wurde wie erwartet fast ausschließlich  $\beta$ -Carotin detektiert.



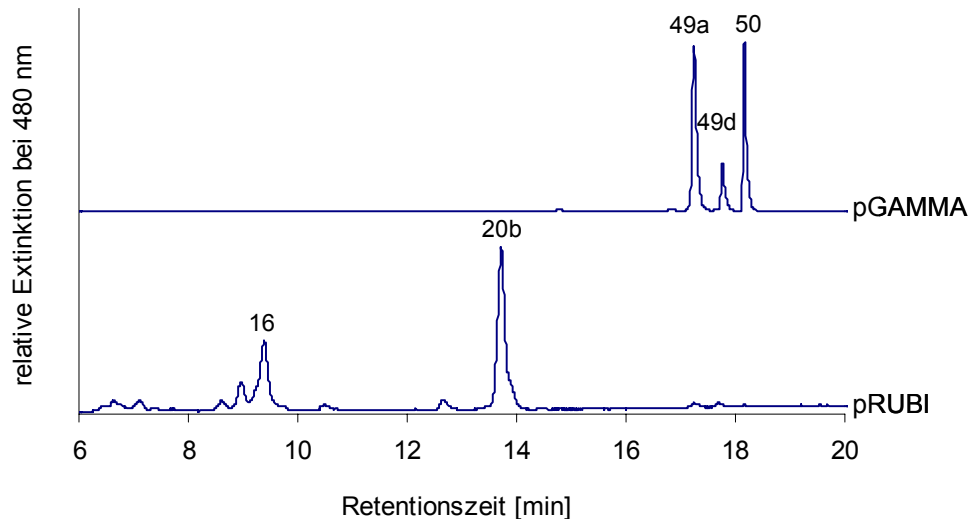
**Abb. 39** Klonierungsstrategie zur Herstellung des Plasmids pRUBI. Aufbau der Plasmide pZEAX und pBAD\_LCYB und die Lage der Restriktionsschnittstellen *Bss*SI (rot) und *Sna*BI (blau). Der Vektor pZEAX enthält bakterielle Gene aus *E. uredoovora* (*crtE*, *crtB*, *crtI* und *crtZ*), der pBAD-Vektor enthält die Carotinoid-Zyklase- $\beta$  (LCYB) aus *C. reinhardtii*.

Parallel zu diesem Experiment wurde der Vektor pACCAR25 $\Delta$ crtX (pZEAX) zunächst mit dem Restriktionsenzym SnaBI vollständig und anschließend mit BssSI unvollständig verdaut (Abb. 38). Aus den Fragmenten wurde im präpartiven Gel die Bande mit 9,7 kb ausgeschnitten, gereinigt und dephosphoryliert. Das LCYB-Gen wurde aus dem pBAD-Vektor durch Restriktion mit SnaBI und BssSI und Gelextraktion (Bande mit 1,6 kb) isoliert und über die neuen Schnittstellen in den offenen, verkürzten Vektor inkloniert. Das neue Plasmid wurde in Top10-Zellen getestet. Die Pigmentanalyse zeigte, dass nun neben Zeaxanthin ein neues Pigment akkumulierte, das als Rubixanthin (3-Hydroxy- $\gamma$ -Carotin) identifiziert wurde (Abb. 41). Die Identifikation des Pigmentes erfolgte anhand seiner intermediären Retentionszeit zwischen Lycopin und  $\beta$ -Carotin, anhand des Vergleichs seines Absorptionsspektrums mit einem Rubixanthin-Referenzspektrum aus der Literatur (Britton et al., 2004) und im Vergleich mit einem Pigmentextrakt aus Rosazea-Früchten, bei denen dieses Pigment typischerweise akkumuliert (Kuhn und Grundmann, 1934). Auf Grund der hohen Menge an Rubixanthin in den Bakterien wurde das Plasmid als pRUBI bezeichnet (Abb. 40).

In einem weiteren Schritt wurde das bakterielle  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase-Gen crtZ mit den Restriktionsenzymen AatII und NsiI aus dem Plasmid pRUBI entfernt (vgl. 3.3.1.1). Die Überhänge wurden mittels Phusion-Polymerase gebluntet, anschließend phosphoryliert und der Vektor religiert. Die HPLC-Analyse eines mit dem resultierenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stammes ergab, dass die Pigmente Lycopin,  $\gamma$ -Carotin und  $\beta$ -Carotin produziert werden (Abb. 41). Das Plasmid wurde als pGAMMA bezeichnet.



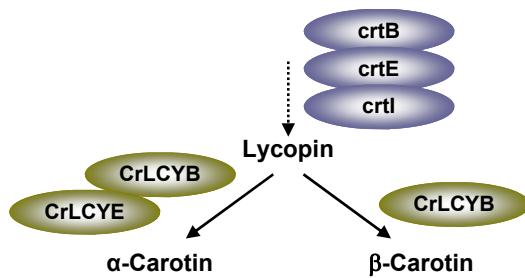
**Abb. 40** Aufbau der Plasmide pRUBI und pGAMMA, die in *E. coli*-Zellen konstitutiv aktiv sind und die Zellen in die Lage versetzen, die in den Chromatogrammen in Abb. 41 detektierten Carotinoide zu produzieren. Die Vektoren tragen Gene aus verschiedenen Organismen: Bakterielle Gene aus *E. uredovora* (*crtE*, *crtB*, *crtI* und *crtZ*), die Carotinoid-Zyklase- $\beta$  (LCYB) aus *C. reinhardtii* sowie ein Chloramphenicol-Resistenzgen (*Cm*).



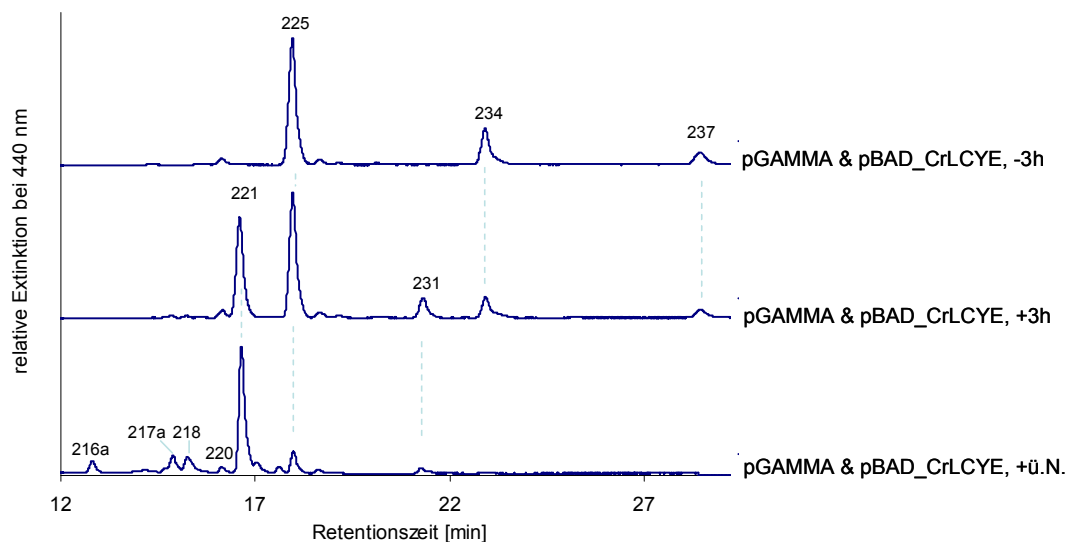
**Abb. 41** HPLC-Chromatogramme von Pigmentextrakten aus DH5 $\alpha$ -Zellen mit den konstitutiv aktiven Plasmiden pGAMMA bzw. pRUBI. Die mit pGAMMA transformierten Bakterien akkumulierten die Carotinoide Lycopin (49a),  $\gamma$ -Carotin (49d) und  $\beta$ -Carotin (50). Die mit pRUBI transformierten Bakterien akkumulierten Zeaxanthin (16) und Rubixanthin (20b). Einen Überblick über den Aufbau des Plasmids gibt das Schema in (Abb. 38). Das Chromatogramm wurde mit der HPLC-Methode 1 erstellt.

### Eignungstest einer Kombination der Lycopinzyklasen aus *C. reinhardtii* zur Synthese von $\alpha$ -Carotin

Vorbereitend zur Herstellung des  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes wurden Versuche durchgeführt, die zeigen sollten, dass die Synthese von  $\alpha$ -Carotin durch heterologe Expression der beiden Lycopinzyklasen aus *C. reinhardtii* in *E. coli* geleistet werden kann. Ein wichtiger Versuch dazu war die Koexpression von pGAMMA und pBAD\_LCYE (Abb. 42). Das Plasmid pGAMMA enthielt wie bereits beschrieben die bakteriellen Gene aus *E. uredoovora* zur Synthese von Lycopin sowie das LCYB-Gen aus *C. reinhardtii*. Auf dem pBAD-Expressionsvektor lag das LCYE-Gen aus *C. reinhardtii*. Vor der LCYE-Induktion enthielten die Bakterien vor allem  $\gamma$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin und Lycopin. In den induzierten Proben konnten drei Stunden nach der Induktion mit 0,2% Arabinose neben  $\beta$ -Carotin,  $\gamma$ -Carotin und Lycopin bereits deutliche Mengen an  $\alpha$ -Carotin (221) detektiert werden. Bei der Induktion über Nacht wurde fast ausschließlich  $\alpha$ -Carotin akkumuliert. Das Pigment  $\alpha$ -Carotin wurde in den Proben anhand eines Pigmentstandards aus Karotten (Sigma) identifiziert. Das Experiment zeigte, dass die Konstruktion eines  $\alpha$ -Carotin produzierenden *E. coli*-Stamms mit der beschriebenen Enzymkombination grundsätzlich möglich ist.



**Abb. 42** Biosyntheseweg von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin und den daran beteiligten Enzyme. Die bakteriellen Gene zur Synthese von Lycopin aus *E. uredovora* sind in Blau, die Lycopinzyklase- $\beta$  und die Lycopinzyklase- $\epsilon$  aus *C. reinhardtii* in Grün dargestellt. Diese Enzymkombination entsteht bei Verwendung des pGAMMA- und des pBAD\_LCYE-Plasmides in *E. coli*. Die HPLC-Analysen dazu sind in der Abb. 43 dargestellt.



**Abb. 43** Vorversuch zur Herstellung eines  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes. Die Abb. zeigt HPLC-Chromatogramme von Top-10-Zellen, die das konstitutiv aktive Plasmid pGAMMA tragen. Es enthält bakterielle Gene zur Carotinoidbiosynthese des Lycopins und ein Lycopin-Zyklase- $\beta$ -Gen (LCYB) aus *C. reinhardtii*. Darüber hinaus enthielten die Bakterien einen zweiten, induzierbaren Vektor, pBAD\_LCYE, der die Lycopin-Zyklase- $\epsilon$  (LCYE) aus *C. reinhardtii* trug. In der für 3 Stunden mit 0,2% Arabinose induzierten Probe (+3h) konnte neben  $\beta$ -Carotin (225),  $\gamma$ -Carotin (234) und Lycopin (237), die auch in der nichtinduzierten Probe (-3h) zu finden waren,  $\alpha$ -Carotin (221) detektiert werden. Das untere HPLC-Chromatogramm wurde aus Pigmentextrakt einer Kultur erstellt, die über Nacht mit 0,2% Arabinose induziert wurde. Die Kultur enthielt praktisch nur noch  $\alpha$ -Carotin. Die Chromatogramme wurde mit den HPLC-Methode 3 erstellt.

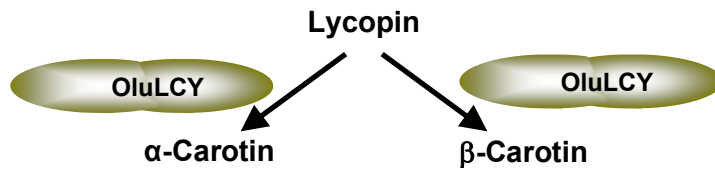
Das Einbringen des Gens LCYE in den Vektor pGAMMA zur Herstellung eines  $\alpha$ -Carotin produzierenden *E. coli*-Stammes gestaltete sich aber in der Praxis als schwierig. Experimentiert wurde mit verschiedenen Klonierungsstrategien. Es wurde versucht das Gen an verschiedenen Orten in den Vektor unter Nutzung unterschiedlicher Ribosomenbindestellen einzubringen. Als problematisch erwies sich dabei unter anderem die Limitierung an geeigneten Restriktionsschnittstellen und die Größe des Vektors. Daher wurde schließlich die nachfolgend beschriebene Strategie gewählt.

### **Eignungstest eines Lycopinzyklase-Fusionsproteins aus der Grünalge *Ostreococcus lucimarinus***

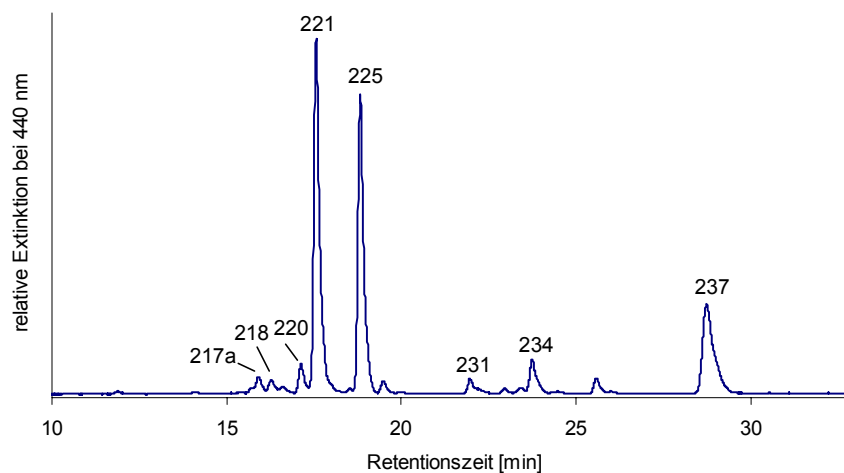
Während der Arbeiten zur Herstellung des  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes gelang es, ein Lycopinzyklase-Fusionsgen aus der Grünalge *Ostreococcus lucimarinus* zu isolieren.

Genomanalysen von *O. lucimarinus* (Palenik et al. 2007) hatten gezeigt, dass in dieser Alge die Lycopin- $\beta$ -Zyklase und die Lycopin- $\epsilon$ -Zyklase zu einem Fusionsprotein vereint sind (Abb. 44). In der Staatsexamensarbeit von Plew (2009) gelang die Amplifikation des Lycopinzyklase-Fusionsgens (LCY) aus genomischer DNA von *O. lucimarinus* und seine Zwischenklonierung in den pGEM-Vektor. Jedoch zeigten die Sequenziererergebnisse, dass das Gen mehrere PCR-bedingte Mutationen aufwies, die zu Aminosäureaustauschen führten. Die Wiederholung der Amplifikation gelang jedoch nicht. Das Gen konnte dann im Rahmen eines Laborpraktikums von Jennifer Elbers und André Busch unter meiner Anleitung mit den Primern OtLYE\_pBAD\_a4p und OtLYE\_pBAD\_e3m amplifiziert werden. Das resultierende PCR-Produkt wurde in den pBAD-TOPO-TA-Expressionsvektor kloniert. Die Orientierung des Gens im pBAD-Vektor wurde mittels Kolonie-PCR verifiziert. Ein Klon enthielt die korrekte Sequenz bis auf einen Aminosäureaustausch an der Position 886 (D  $\rightarrow$  G). Trotzdem wurde das Gen schon in Lutein produzierenden Zellen getestet. Bei einer Induktion mit 0,2% Arabinose über Nacht konnten  $\alpha$ -Carotin-Mengen nachgewiesen werden, die über 50% des Gesamtpigmentgehalts ausmachten. Der Aminosäureaustausch wurde im Rahmen eines Laborpraktikums von zwei Praktikantinnen durch den Austausch eines Sequenzstückes mit der korrekten Teilsequenz aus einem weiteren Klon repariert. Beim Test des reparierten Konstruktes pBAD\_OluLCY in Lycopin produzierenden Top10-Zellen wurden nach Induktion mit 0,2% Arabinose für 3 Stunden im Pigmentextrakt neben Lycopin auch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin detektiert. Die Identifikation erfolgte mit Referenzpigmenten. Das Verhältnis von  $\alpha$ - zu  $\beta$ -Carotin lag dabei im Durchschnitt bei 1,15:1. Damit schien das OluLCY-Gen besonders gut geeignet, um einen  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstamm herzustellen.

Darüber hinaus würde zur Expression der Fusionszyklase aus *O. lucimarinus* nur eine Ribosomenbindestelle benötigt.



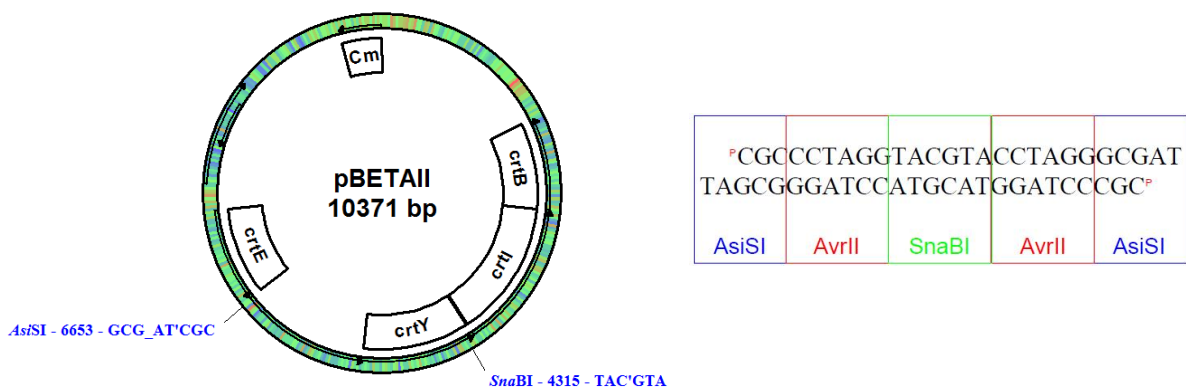
**Abb. 44** Biosyntheschema der Bildung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin aus Lycopin. Die Lycopinzyklase aus der Grünalge *O. lucimarinus* (OluLCY) ist ein Fusionsprotein, das eine LCYB- und eine LCYE-Domäne enthält und dadurch beide Pigmente synthetisieren kann.



**Abb. 45** Chromatogramm eines Pigmentextraktes aus Top10-Zellen mit den Plasmiden pLYCO II und pBAD\_OluLCY in LB-Medium nach Induktion mit 0,2% Arabinose über Nacht und einer Anzuchttemperatur von 28 °C. Das Chromatogramm wurde mit der HPLC-Methode 3 erstellt. Im Chromatogramm wurden die Pigmente  $\alpha$ -Carotin (221),  $\beta$ -Carotin (225) und Lycopin (237) identifiziert. Eine detaillierte Zuordnung der Pigmentnummern zu der Pigmentbezeichnung ist in der (Tabelle 1) aufgeführt. Das Chromatogramm wurde mit der HPLC-Methode 3 erstellt.

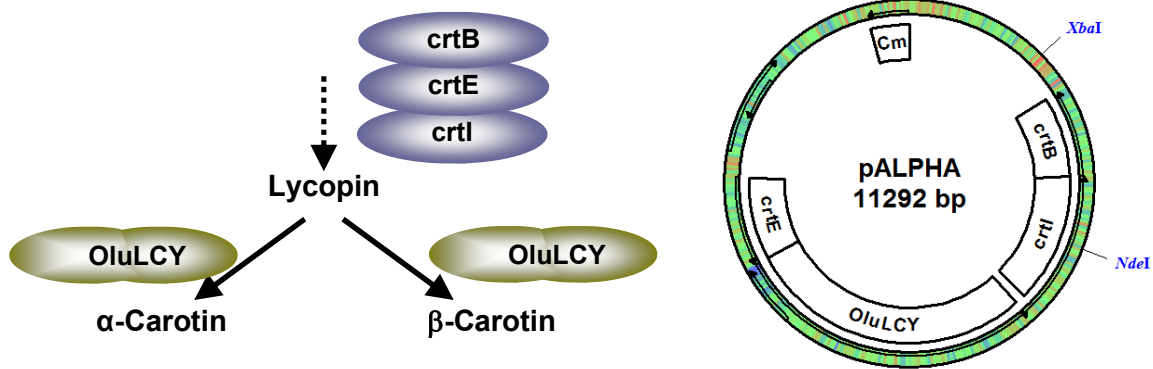
### Klonierungsstrategie und Test des $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes

Das Plasmid pBETA II bot zunächst keine geeigneten Schnittstellen zur Einbringung des Gens. Daher wurde ein Oligonukleotid der Sequenz „CGCCCTAGGTACGTACCTAGGGCGAT“ designt, das aus den Restriktionsschnittstellen für AsiSI, AvrII, SnaBI, AvrII und AsiSI besteht und mit 5'-Phosphorylierung bestellt wurde. Bei der Hybridisierung mit sich selbst entstand ein doppelsträngiges DNA-Fragment mit AT-Überhängen (Abb. 46), welches über die AsiSI-Schnittstelle in den pBETA II-Vektor einkloniert wurde. Da das DNA-Fragment spiegelsymmetrisch aufgebaut ist, musste bei seiner Einklonierung nicht auf die Orientierung geachtet werden. Im zweiten Schritt wurde das resultierende Konstrukt mit SnaBI geschnitten und religiert. Dabei verkürzte sich der Vektor um ein 2,3 kB langes Sequenzstück, welches das crtY-Gen und das zwischen crtE und crtY lokalisierte defekte crtX-Gen enthielt. Im dritten Schritt wurde das OluLCY-Gen mittels der Primer pACC-LCY\_a1p und pACC-LCY\_e1m in einer PCR-Reaktion mit den Restriktionsschnittstellen für PacI und SnaBI versehen und in pGEM T-easy zwischenkloniert. Im vierten Schritt wurde das OluLCY-Gen aus dem Zwischenklonierungsvektor mit PacI und SnaBI ausgeschnitten und über die AvrII- und die SnaBI-Schnittstelle in den modifizierten pBETA II-Vektor eingebracht. Das resultierende Plasmid wurde als pALPHA bezeichnet (Abb. 47).



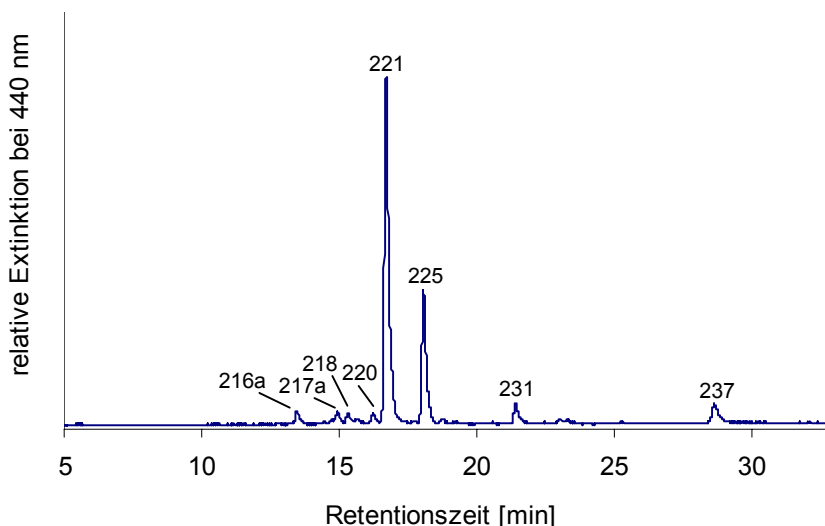
**Abb. 46 Schema der für die Konstruktion von pALPHA verwendeten Restriktionsschnittstellen.** Links der Aufbau des Vektors pBETA II mit den bakteriellen Enzymen crtE, crtB, crtI und crtY aus *E. uredoovora* zur Biosynthese von  $\beta$ -Carotin in *E. coli*. In Blau ist die Lage der Restriktionsschnittstellen für AsiSI und SnaBI markiert. Rechts die mit sich selbst hybridisierende Oligonukleotidsequenz mit Schnittstellen für AsiSI, AvrII und SnaBI, die in die AsiSI-Schnittstelle von pBETA II einligiert wurde.





**Abb. 47 Schema des Plasmides pALPHA und der Funktion seiner Carotinoidbiosynthesegene.** Links sind die Biosynthesewege gezeigt, die durch auf pALPHA kodierte Enzyme katalysiert werden. In Blau sind die bakteriellen Gene *crtB*, *crtE* und *crtI* aus *E. uredoovora* dargestellt, in Grün die algale Lycopinzyklase aus *O. lucimarinus* (*OluLCY*). Rechts ist die Anordnung der Gene auf pALPHA gezeigt, In Blau sind die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *XbaI* und *NdeI* markiert.

In der Pigmentanalyse wurde deutlich, dass bei der Expression von pALPHA in *E. coli* alpha-Carotin und beta-Carotin im Verhältnis von etwa 3:1 auftraten (Abb. 48). Die Identität der Pigmente wurde in der HPLC-Analyse mit einem Pigmentstandard verifiziert. Die Standard-Inkubationstemperatur für die Carotinoidbiosynthese in den *E. coli*-Zellen lag bei 28 °C. Es wurden auch Ansätze bei 22, 28, 33 und 37 °C sowie verschiedene Bakterienstämme (Top10, DH5alpha und XL1-Blue) getestet. Dabei trat keine wesentliche Änderung in der Stöchiometrien von alpha-Carotin und beta-Carotin auf.



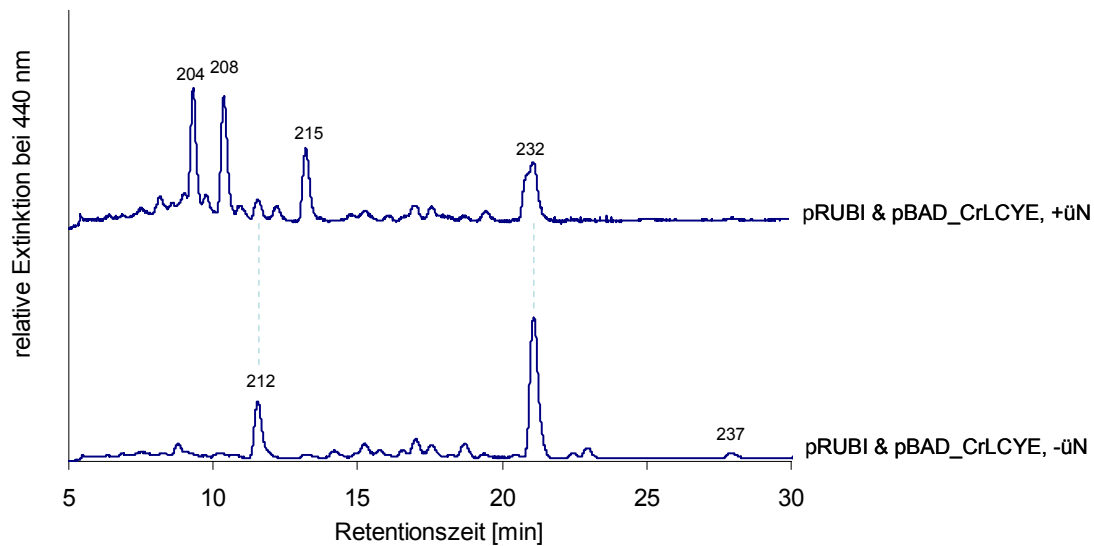
**Abb. 48 Chromatogramm des Pigmentextraktes aus Top10-Zellen mit dem Plasmid pALPHA nach Anzucht bei 28 °C.** In der Probe konnten all-trans-alpha-Carotin (221) und beta-Carotin (225) als Hauptpigmente identifiziert werden. Daneben wurden die Pigmente 13-cis- alpha-Carotin (217a), 13'-cis-alpha-Carotin (218), 13-cis-beta-Carotin (220), delta-Carotin (231) und Lycopin (237) detektiert. Das Chromatogramm wurde mit der HPLC-Methode 3 erstellt.

### 3.3.1.4. Herstellung eines Lutein produzierenden Bakterienstammes

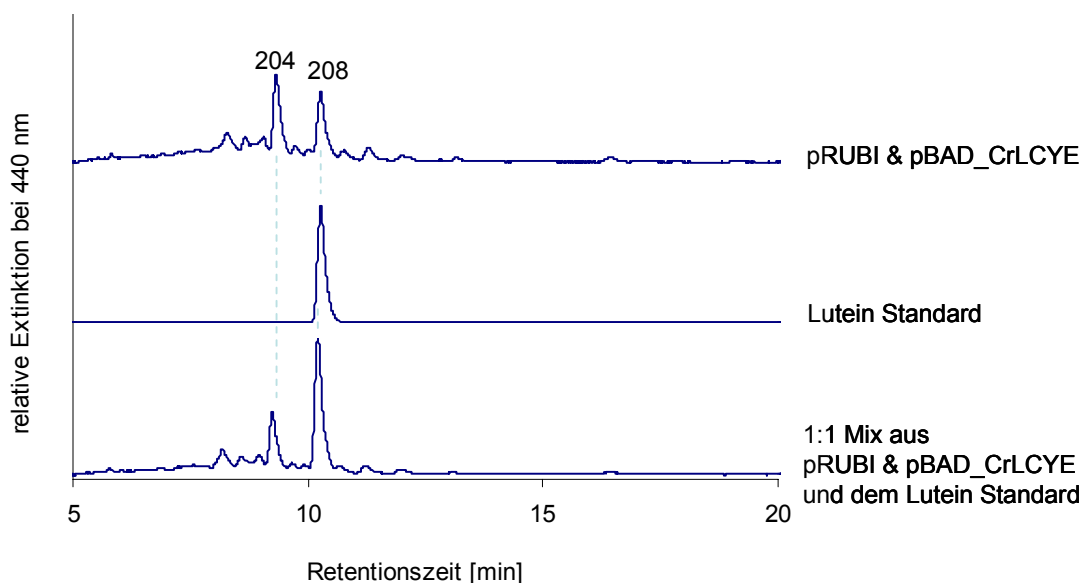
Um nachzuweisen, dass die BKT das Schlüsselenzym in der Biosynthese von 4-Ketolutein aus Lutein ist, war ein Lutein produzierender Bakterienstamm notwendig. Die Biosynthese von Lutein erfolgt durch eine Hydroxylierung der beiden Iononringe des  $\alpha$ -Carotins. Um den Lutein produzierenden Bakterienstamm auf der Basis des Plasmids pALPHA herzustellen, wurden verschiedene Carotinoid-Hydroxylasen getestet. Eine der Hydroxylasen wird im Folgenden vorgestellt.

#### Eignungstest der Hydroxylase CrtZ aus dem Bakterium *Erwinia uredovora*

Das CrtZ-Enzym aus *E. uredovora* vermag  $\beta$ -Carotin zu hydroxylieren (Misawa et al., 1990). Allerdings war noch nicht untersucht worden, ob CrtZ auch den  $\beta$ -Iononring im  $\alpha$ -Carotin und möglicherweise auch dessen Konstitutionsisomer, den  $\epsilon$ -Iononring hydroxylieren kann. Bei der Komplementierung von pGAMMA mit pBAD-LCYE in Top10-Zellen entstand bei der Induktion fast ausschließlich  $\alpha$ -Carotin (Kap. 0). Der Vektor pRUBI unterscheidet sich von dem Vektor pGAMMA nur durch die zusätzliche Anwesenheit des crtZ-Gens. Bei Kombination von pRUBI mit dem pBAD-Konstrukt pBAD\_LCYE wurde in den Pigmenttests nach Induktion über Nacht in Top10-Zellen Zeinoxanthin gefunden (Abb. 49). Zeinoxanthin ist ein Pigment, bei dem der  $\beta$ -Iononring des  $\alpha$ -Carotins hydroxyliert ist. Daneben akkumulierten Rubixanthin und Lutein. Das Pigment Lutein wurde mittels Pigmentstandard nachgewiesen (Abb. 50). Daneben trat noch ein weiteres Pigment mit einer etwas kürzeren Retentionszeit als Lutein auf, das das gleiche Spektrum aufwies wie Lutein. Das Pigment mit der etwas verkürzten Retentionszeit wurde vorläufig auf Grund der Retentionszeit und des Spektrums als Luteinderivat identifiziert. Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Loroxanthin handelte. Loroxanthin besitzt noch eine Hydroxylierung mehr als Lutein an der Position 9 und würde unter den gleichen Chromatographiebedingungen eine Retentionszeit von 7,3 Minuten aufweisen. Der Unterschied in der Retentionszeit macht damit 3,2 Minuten aus. In der nicht induzierten Probe wurde vor allem Rubixanthin und Zeaxanthin gefunden (Abb. 49). Insgesamt blieb zunächst festzuhalten, dass sich die crtZ offensichtlich eignet, um einen Lutein produzierenden Bakterienstamm herzustellen.



**Abb. 49** Vorversuch zur Herstellung eines Lutein produzierenden Bakterienstammes. Im Diagramm sind HPLC-Chromatogramme von Top-10-Zellen gezeigt, die das konstitutiv aktive Plasmid pRUBI tragen. Es enthält bakterielle Gene zur Carotinoidbiosynthese des Lycopins und ein Lycopin-Zyklase- $\beta$  Gen (LCYB) aus *C. reinhardtii* sowie das bakterielle  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase-Gen crtZ. Darüber hinaus enthielten die Bakterien einen zweiten induzierbaren Vektor, pBAD\_LCYE, der das Gen der Lycopin-Zyklase- $\epsilon$  (LCYE) aus *C. reinhardtii* trug. Oben ist das Chromatogramm der über Nacht mit 0,2% Arabinose induzierten Probe (üN+) gezeigt, unten das Chromatogramm aus Pigmentextrakt der gleichen Kultur ohne Induktion (üN-). In den Chromatogrammen konnten die Pigmente Lycopin (237), Rubixanthin (232), Zeinoxanthin (215), Zeaxanthin (212), Lutein und ein potentielles Luteinderivat identifiziert werden. Verwendet wurde die HPLC-Methode 3.

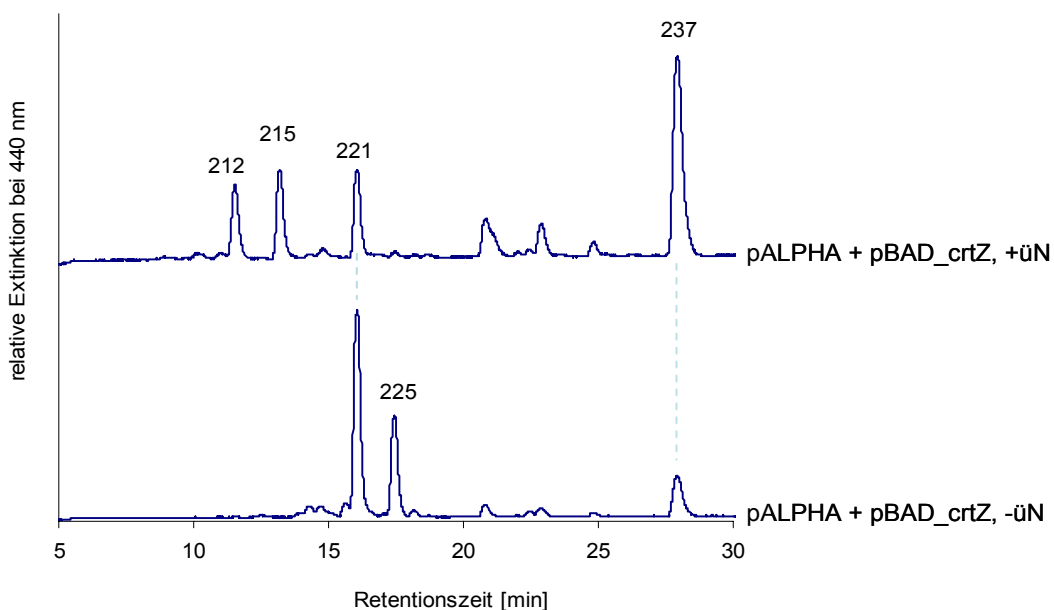


**Abb. 50** Identifizierung des Luteins mittels eines Pigmentstandards. Oben ist das Chromatogramm eines Pigmentextraktes dargestellt, der aus Top10-Zellen isoliert wurde, die den Vektor pRUBI und den Vektor pBAD\_LCYE trugen und mit 0,2% Arabinose über Nacht induziert wurden. In der Mitte ist

ein Chromatogramm vom Pigmentstandard Lutein gezeigt, der aus Erbsen präpariert wurde. Unten ein Chromatogramm von einem Mix der beiden Pigmentproben. Verwendet wurde die HPLC-Methode 3.

In einem weiteren Experiment wurde das crtZ-Gen in ein separates Plasmid, den pBAD-TOPO-Vektor kloniert und dann in Kombination mit pALPHA in Top10-Zellen getestet.

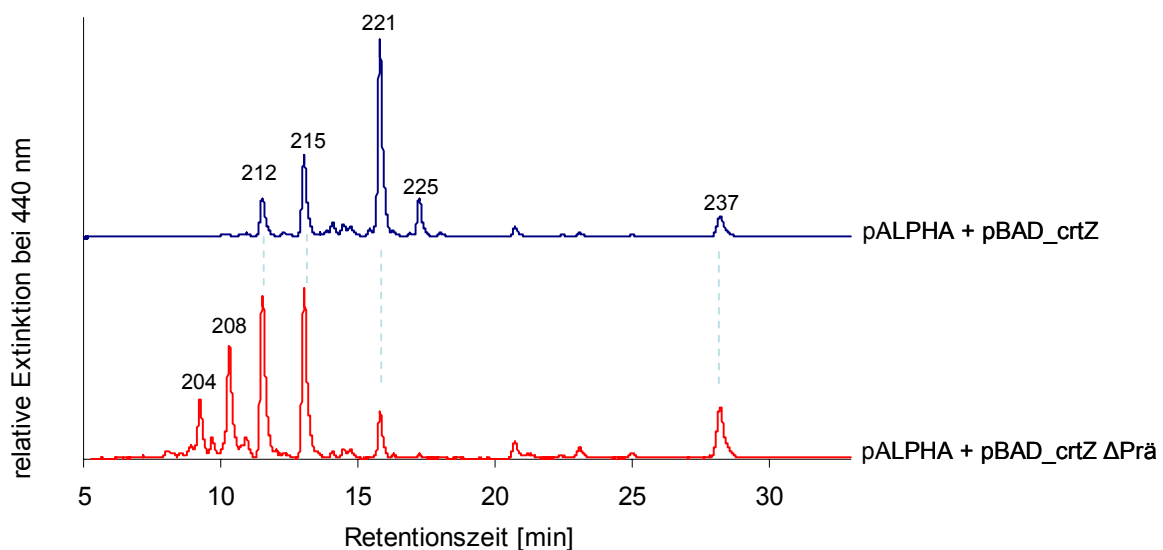
Als Ergebnis wurde die gleiche Pigmentzusammensetzung wie im vorhergehend beschriebenen Experiment der Koexpression von pRUBI und pBAD-LCYE erwartet. Entgegen der Annahme fiel das Ergebnis der heterologen Expression jedoch anders aus und zeigte bei der Induktion über Nacht eine Akkumulation der Pigmente Zeaxanthin, Zeinoxanthin,  $\alpha$ -Carotin und Lycopin, sowie einige mengenmäßig unbedeutendere Pigmente. In der nicht induzierten Probe stellten  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin und Lycopin die mengenmäßig dominierenden Pigmente dar. Lutein wurde nur in verschwindend geringen Mengen nachgewiesen (Abb. 51).



**Abb. 51** Chromatogramm von Pigmentextrakt aus Top10-Zellen mit den Plasmiden pALPHA und pBAD\_crtZ. Die Induktion erfolgte mit 0,2% Arabinose über Nacht. Oben ist die induzierte Probe (üN+) gezeigt, darunter die nicht induzierte Probe (üN-). In den Chromatogrammen konnten die Pigmente Lycopin (237),  $\beta$ -Carotin (225),  $\alpha$ -Carotin (221), Zeinoxanthin (215) und Zeaxanthin (212) identifiziert werden. Verwendet wurde die HPLC-Methode 3.

### Der Einfluss der Vektorpräsequenz auf die Substratspezifität der crtZ

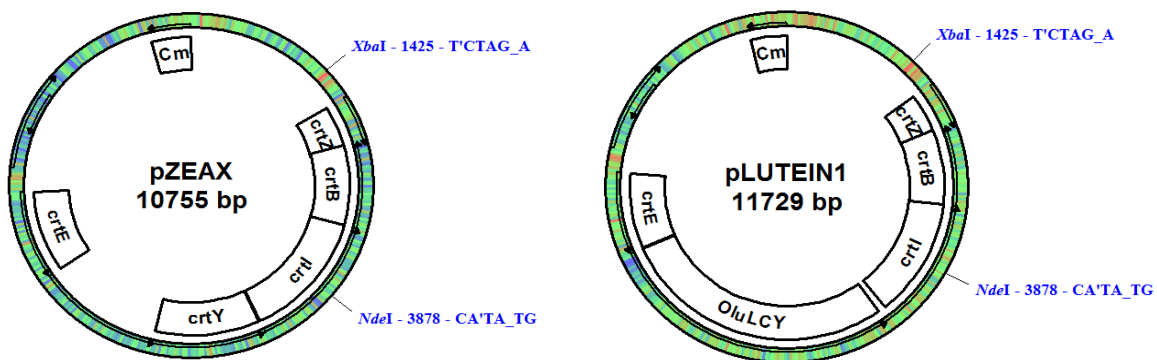
Bei der Suche nach einer Ursache für die zwei unterschiedlichen Ergebnisse bei vermeintlich identischer Genausstattung fiel die Vektorpräsequenz des pBAD-Expressionsvektors ins Auge. Der Vektor fügte dem Protein, in diesem Fall der crtZ, N-Terminal 14 Aminosäuren an. Daher wurde ein Konstrukt (pBAD\_crtZ $\Delta$ Prä) ohne diese Präsequenz hergestellt. Dazu wurde mittels der PCR-Primer CrtZ\_NcoI (ACCATGGGTATGTTGTGGATTGGAATGCCCTG) und CrtZ\_TAA-Stop (TTACTTCCCGGATGCGGGCTCAT) eine NcoI-Schnittstelle am 5'-Ende des crtZ-Gens eingefügt und die zwischen den beiden NcoI-Schnittstellen liegende Präsequenz wegverdaut. Der Test der beiden Konstrukte mit und ohne Präsequenz erfolgte zusammen mit pALPHA in Top10-Zellen bei 28 °C und Induktion über Nacht (Abb. 52). Bei dem Konstrukt, das die Expression von CrtZ ohne Präsequenz erlaubte, waren die mengenmäßig bedeutendsten Pigmente Lycopin,  $\alpha$ -Carotin, Zeinoxanthin, Zeaxanthin, Lutein und das Luteinderivat. Bei Expression der CrtZ mit Präsequenz akkumulierten nur die Pigmente Lycopin,  $\beta$ -Carotin,  $\alpha$ -Carotin, Zeinoxanthin und Zeaxanthin.



**Abb. 52** Vergleich der Substratspezifität des Enzyms CrtZ mit und ohne die durch den pBAD-TOPO-Vektor hinzugefügte Präsequenz in Top10-Zellen mit dem Plasmid pALPHA. Die CrtZ wurde in pBAD-TOPO als Konstrukt pBAD\_crtZ bzw. pBAD\_crtZ $\Delta$ Prä durch Zugabe von 0,2% Arabinose über Nacht exprimiert. In Blau gezeigt ist das Chromatogramm der Probe der CrtZ mit Präsequenz, in Rot das Chromatogramm mit dem Konstrukt ohne Präsequenz. Bei den im Chromatogramm beschrifteten Pigmenten handelt es sich um Lycopin (237),  $\beta$ -Carotin (221),  $\alpha$ -Carotin (231), Zeinoxanthin (215), Zeaxanthin (212), Lutein (208) und das potentielle Luteinderivat (204). Verwendet wurde die HPLC-Methode 3.

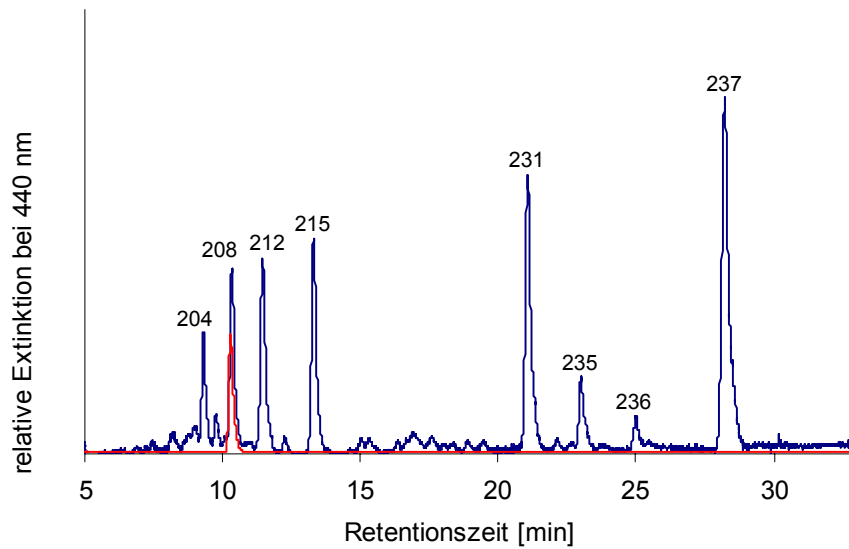
### Klonierungsstrategie und Test des Konstrukts pLUTEIN

Ausgehend von den Vorversuchen schien die *CrtZ* zu diesem Zeitpunkt der Arbeit für die Herstellung eines Lutein produzierenden Bakterienstammes geeignet. Als Grundlage wurde das Konstrukt pALPHA verwendet. Der Vektor wurde mit den beiden Enzymen *Xba*I und *Nde*I aufgeschnitten (Abb. 47). In einer Gelextraktion wurde das 9,3 kB große Stück aufgereinigt und dephosphoryliert. Parallel wurde der Vektor pZEAX mit den gleichen Enzymen aufgeschnitten. In einer Gelextraktion wurde das 2,5 kB große Stück aufgereinigt. Anschließend wurden beide Fragmente ligiert. Als Resultat entstand der Vektor pLUTEIN der im Gegensatz zum pALPHA noch zusätzlich das *crtZ*-Gen trägt (Abb. 53).



**Abb. 53** Aufbau der Plasmide pZEAX und pLUTEIN. Beide Plasmide tragen die bakteriellen Gene *crtE*, *crtB*, *crtI*, und *crtZ* aus *E. uredovora*. Das Plasmid pLUTEIN trägt statt des bakteriellen Lycopin- $\beta$ -zyklase-Gens *crtY* das Lycopinzyklase-Gen *OluLCY* aus *O. lucimarinus*. In Blau sind die Restriktionsschnittstellen für *Xba*I und *Nde*I markiert.

Der Test des Konstruktes pLUTEIN erfolgte in Top10-Zellen bei 28 °C. Die HPLC-Analyse des Pigmentextraktes brachte ein komplexes Pigmentmuster zum Vorschein (Abb. 46). Es bestand aus den Pigmenten Lycopin,  $\delta$ -Carotin, Zeinoxanthin, Zeaxanthin, Lutein und dem Luteinderivat. Die Identität des Luteins wurde in der HPLC-Analyse durch einen Standard bestätigt (Abb. 46). Auch bei diesem Konstrukt brachten Variationen in der Anzuchtstemperatur der Kulturen keine Verbesserung der Luteinausbeute.



**Abb. 54** HPLC-Chromatogramm eines Pigmentextraktes aus Top10-Zellen mit dem Plasmid pLUTEIN nach Anzucht der Kultur bei 28 °C. In Rot überlagert ist ein mit den gleichen Chromatographiebedingungen gemessener Lutein-Standard. Bei den Pigmenten handelt es sich um Lycopin (237), 9-cis-Lycopin (236), 13-cis-Lycopin (235),  $\delta$ -Carotin (231), Zeinoxanthin (215), Zeaxanthin (212), Lutein (208) und ein potentielles Luteinderivat (204). Verwendet wurde die HPLC-Methode 3.

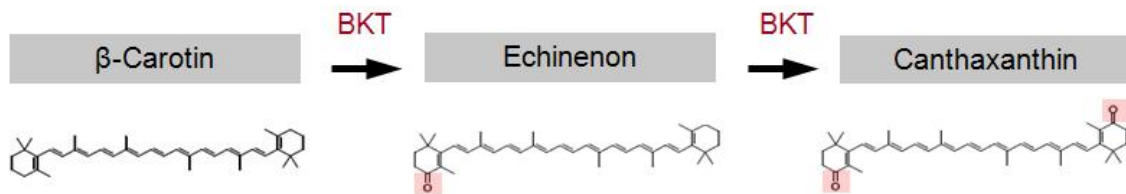
### **3.3.2. Funktionelle Charakterisierung des Schlüsselenzyms in der Biosynthese der Ketocarotinoide, der $\beta$ -Carotin-Ketolase (BKT) aus *C. reinhardtii***

Lohr et al. (2005) identifizierten in EST-Sequenzen von *C. reinhardtii* die potentielle  $\beta$ -Carotin-Ketolase (BKT) auf Grund von Sequenzhomologie mit den BKT-Enzymen aus *H. pluvialis*. Das Gen wurde im Vorfeld der Arbeit amplifiziert, zwischenkloniert (Schmidt, 2007) und später umkloniert in den pBAD Expressionsvektor (Bauch, 2007). Es gelang im Vorfeld der Arbeit nicht, die Funktionsfähigkeit der BKT in einem in-vitro-Assay nach den Angaben von Fraser et al. (1997) nachzuweisen. Daher wurde das Enzym durch Expressionsversuche in Bakterien getestet, die potentielle Substrate produzieren. Bereits in meiner Diplomarbeit konnte ich die BKT in  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin produzierenden Zellen testen. Die nachfolgend vorgestellten Experimente zur BKT in  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin produzierenden Bakterien haben dennoch ihre Berechtigung. Zum einen wurde erst im Laufe der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass der  $\beta$ -Carotin produzierende Vektor, der uns von einer Arbeitsgruppe aus Freiburg übergeben wurde, falsch deklariert war und eine unerwartete Genauausstattung besaß, die eine Wiederholung der Versuche notwendig machte. Des Weiteren gehen die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Versuche über die Arbeiten von Bauch (2007) weit hinaus, da durch die in der vorliegenden Arbeit neu hergestellten Plasmide (Kapitel 3.2.1) eine Reihe weiterer Substrate getestet werden konnten. Daneben wurde auch die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase, die CHYB, in der vorliegenden Arbeit untersucht. Aus den Ergebnissen der BKT- und CHYB-Charakterisierung sollen Aussagen über den Reaktionsweg vom  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin abgeleitet werden. Von besonderem Interesse war die Frage, ob die BKT auch  $\alpha$ -Carotin und davon abgeleitete Pigmente ketolieren kann und damit das Schlüsselenzym zur Bildung von 4-Ketolutein darstellt, das neben Astaxanthin das mengenmäßig wichtigste Ketocarotinoid in den Dauerstadien der Grünalgen war.

#### **3.3.2.1. Funktionsnachweis der BKT in $\beta$ -Carotin produzierenden Top10-Zellen**

In der Abb. 55 ist ein Schema der erwarteten Ketolierung von  $\beta$ -Carotin durch das Enzym BKT aus *C. reinhardtii* aufgeführt. Ein aktives Enzym sollte das in den mit pBETA II transformierten Top10-Zellen produzierte  $\beta$ -Carotin durch Einfügen einer Ketogruppe an der Position 4 zu Echinenon und durch Einfügen einer weiteren Ketogruppe an der Position 4' zu Canthaxanthin umwandeln. In einem Pigmentextrakt sollten das Substrat, das Zwischenprodukt und das Endprodukt zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion nachweisbar sein.





**Abb. 55** Schema der erwarteten Ketolase-Reaktion durch das Enzym BKT aus *C. reinhardtii*, ausgehend von  $\beta$ -Carotin über Echinenon mit einer Ketogruppe an Position 4, zu Canthaxanthin mit Ketogruppen an den Positionen 4 und 4'.

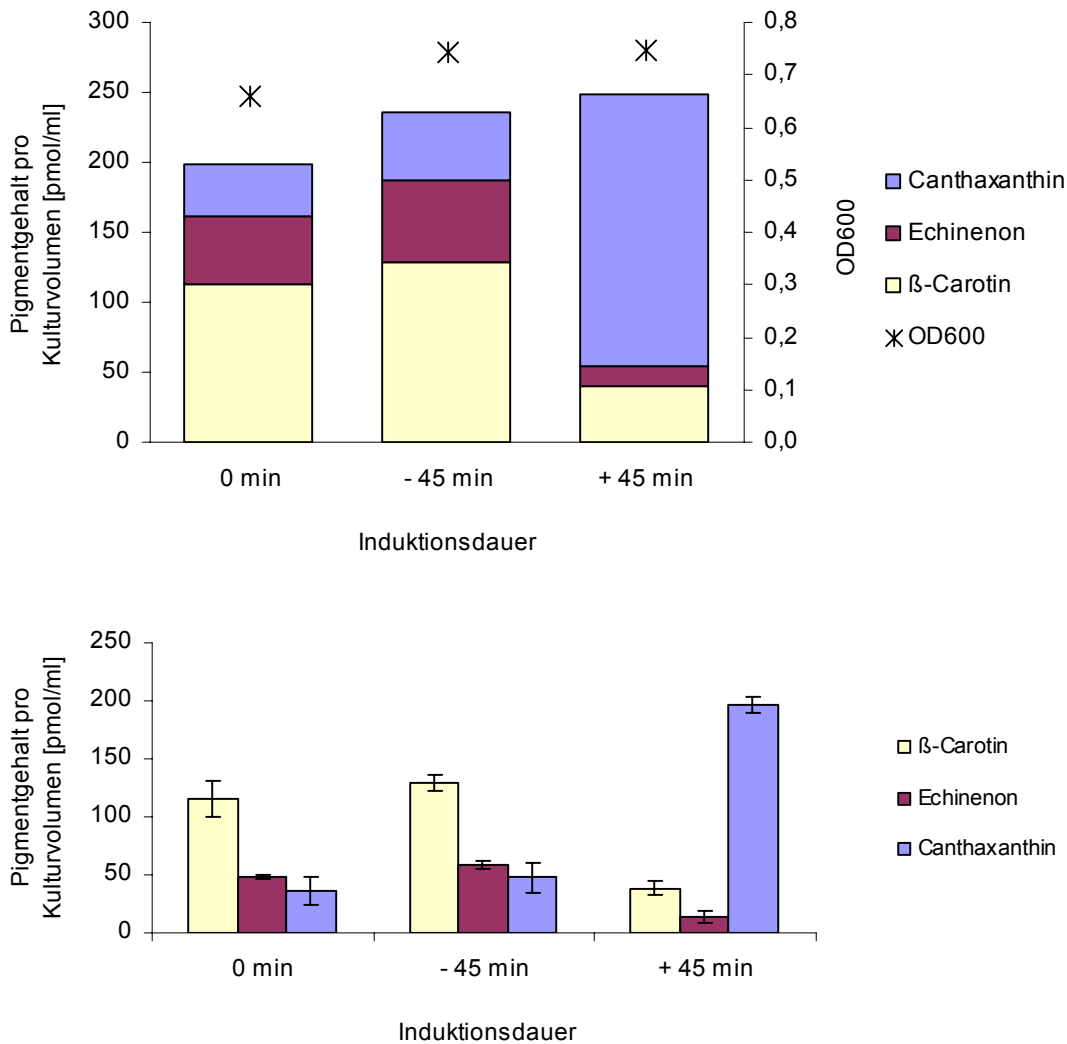
Die Überexpression des BKT-Gens im pBAD-Vektor (pBAD\_CrBKT\_5.1) erfolgte durch Induktion mit 0,2 % Arabinose bei 28 °C in Top10-Zellen, die das konstitutiv aktive Plasmid pBETA II trugen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Pigmente extrahiert und mittels HPLC-Methode 3 analysiert.

In den  $\beta$ -Carotin produzierenden Top10 -Zellen mit dem pBAD\_CrBKT\_5.1-Konstrukt konnten vor der Induktion Peaks detektiert werden, deren Retentionszeiten und Spektren sich eindeutig den erwarteten Substraten 9-*cis*- und all-*trans*- $\beta$ -Carotin zuordnen ließen. 45 Minuten nach der Induktion mit 0,2% Arabinose konnten neben  $\beta$ -Carotin Pigmente mit Ketocarotinoidspektren nachgewiesen werden. Canthaxanthin konnte anhand eines vorhandenen Referenzpigmentes identifiziert werden. Mit Hilfe von Spektren aus der Literatur (Britton et al., 2004) und anhand der erwarteten verkürzten Retentionszeiten konnte auch Echinenon identifiziert werden, welches das Zwischenprodukt auf dem Weg von  $\beta$ -Carotin zum Canthaxanthin darstellt (Abb. 55). Neben den Hauptpeaks, bei denen es sich um die all-*trans*-Isomere der Pigmente handelte, traten noch weitere, kleinere Peaks auf. Den Absorptionsspektren nach handelte es sich dabei um *cis*-Derivate, die sich durch eine deutliche Absorptionsschulter im UV-Bereich zu erkennen gaben. Den Hauptanteil der Pigmente machten die all-*trans*-Formen der Pigmentspezies aus. Durch die Katalyse änderte sich das Mengenverhältnis von *cis*- und *trans*-Carotinoiden nur unwesentlich. Daher wurden die *cis*- und all-*trans*-Isomere der gleichen Pigmentspezies in Abb. 56 zur besseren Übersicht zusammengefasst. Details können jedoch den Chromatogrammen der Pigmentanalyse im Anhang A.8 entnommen werden.

Bereits 45 Minuten nach der Induktion war in der induzierten Probe fast ausschließlich Canthaxanthin vorhanden, der  $\beta$ -Carotin-Gehalt war deutlich geringer als zum Startzeitpunkt. In der nicht induzierten Probe stieg der Canthaxanthingehalt nur unwesentlich an. Während der Induktion nahm die Pigmentmenge insgesamt nur leicht zu. Die Ergebnisse konnten in allen drei Wiederholungsmessungen beobachtet werden.

## ERGEBNISSE

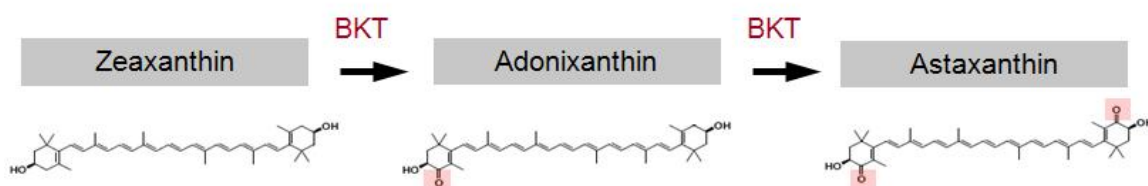
Als Kontrollen wurden DH5 $\alpha$ -Zellen mit dem Plasmid pBETA II und einem pBAD-Vektor ohne BKT-Gen, mit dem Konstrukt pBAD\_BKT\_5.1 ohne das Plasmid pBETA II, und mit dem Plasmid pBETA II ohne das Konstrukt pBAD\_BKT\_5.1 transformiert und Pigmentextrakte vor und nach Induktion durch Arabinose analysiert. Bei keinem dieser Kontrolllexperimente konnten Ketocarotinoide nachgewiesen werden.



**Abb. 56** Ergebnis der heterologen Expression der CrBKT in  $\beta$ -Carotin produzierenden Top10-Zellen. Im oberen Diagramm sind die Zusammensetzung des Gesamtpigmentgehalts zum Startzeitpunkt der Induktion und nach 45 Minuten mit und ohne Induktion sowie die OD600 der Bakterienkulturen dargestellt. Im unteren Diagramm ist die Pigmentzusammensetzung der jeweiligen Proben noch einmal unter Angabe der Fehlerbalken angeführt. Die Datengrundlage bildeten drei Wiederholungsmessungen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 28 °C, die Induktion mit 0,2% Arabinose.

### 3.3.2.2. Funktionsnachweis der BKT in Zeaxanthin produzierenden Top10-Zellen

Die Abb. 57 zeigt ein Schema der erwarteten Ketolase-Reaktion, falls das Enzym BKT aus *C. reinhardtii* auch Zeaxanthin als Substrat akzeptiert. In diesem Fall sollte das Enzym das Pigment Zeaxanthin, welches in den Zeaxanthin produzierenden Top10-Zellen vorherrschend ist, durch Einfügen einer Ketogruppe an der Position 4 zu Adonixanthin und einer weiteren Ketogruppe an der Position 4' zu Astaxanthin umwandeln. In einem Pigmentextrakt sollten bei einem aktiven Enzym das Substrat, das Zwischenprodukt und das Endprodukt zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion nachweisbar sein.



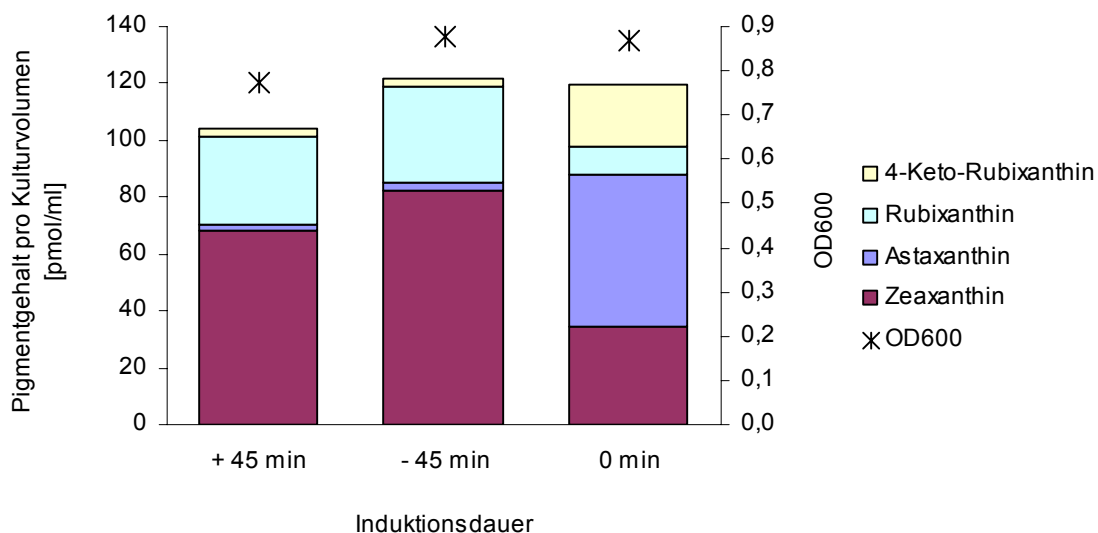
**Abb. 57** Schema der erwarteten Ketolase-Reaktion durch das Enzym BKT aus *C. reinhardtii*, ausgehend von Zeaxanthin über Adonixanthin mit einer Ketogruppe an Position 4, zu Astaxanthin mit Ketogruppen an den Positionen 4 und 4'.

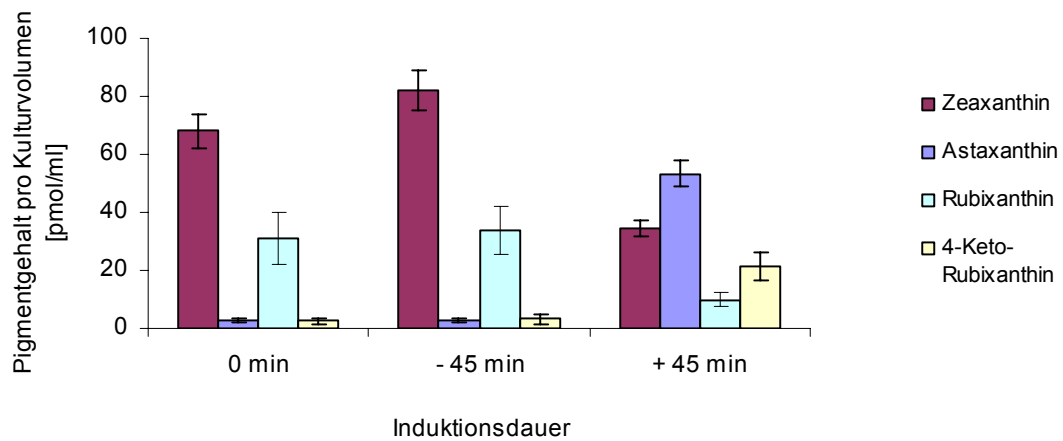
Der Test erfolgte analog zu dem vorhergehend beschriebenen Versuch. Die Anzucht der Zeaxanthin produzierenden Top10-Zellen mit dem pBAD\_CrBKT\_5.1-Konstrukt erfolgte bei 28 °C, dann wurde der Ansatz aufgeteilt. Einer der beiden Ansätze wurde mit 0,2% Arabinose induziert und der zweite Ansatz diente als Kontrolle. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und nach dem Standardprotokoll aufgeschlossen und extrahiert. Vor der Induktion waren zwei deutliche Peaks von *trans*- und *cis*-Zeaxanthin vorhanden (vgl. Anhang A.8). Die Spektren stimmten mit den Literaturwerten überein. *Trans*-Zeaxanthin konnte zusätzlich durch Vergleiche mit einem Pigment-Standard identifiziert werden. 45 Minuten nach der Induktion mit 0,2 % Arabinose zeigte der HPLC-Lauf neben den Zeaxanthin-Peaks weitere Peaks mit Ketocarotinoidspektrum. Durch Vergleich mit einem vorliegenden Referenzpigment konnte das all-*trans*-Astaxanthin ebenfalls zweifelsfrei identifiziert werden. Das Intermediat Adonixanthin mit einer Ketogruppe wurde vorläufig über die intermediäre Retentionszeit und nach einem Referenzspektrum in Britton et al. (2004) bestimmt. Die *cis*-Derivate von Astaxanthin konnten durch Vergleiche mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Isomerspektren-Datenbank identifiziert werden (3.1.3.4). Weitere Isomere wurden anhand ihrer ausgeprägten Schulter im UV-Bereich, ähnlichen Retentionszeiten und anhand ihrer Spektren im Vergleich zu Literaturwerten bestimmt. Nach 45 Minuten hatte die Menge an Astaxanthin in der induzierten Probe stark zugenommen und Zeaxanthin abgenommen. Die Pigmentmenge stieg insgesamt leicht an.

## ERGEBNISSE

In den Zellen wurde auch Rubixanthin (3-Hydroxy- $\gamma$ -Carotin) produziert, das nur einen  $\beta$ -Iononring besitzt. Der Nachweis des Pigments wurde durch Vergleich seines UV/VIS-Spektrums mit Literaturdaten sowie dem Vergleich mit einem Pigmentextrakt aus Rosacea-Früchten geführt, in denen diese Pigmentspezies auftritt (Britton et al. 2004). Die Akkumulation von Rubixanthin in *E. coli* nach Transformation mit dem Plasmid pACCAR25 $\Delta$ crtX ist auch von anderen Autoren beschrieben worden (Choi et al, 2007). 45 Minuten nach der Induktion entstand ein neuer Peak mit einer etwas verkürzten Retentionszeit und mit einem Maximum bei 472,0 nm. Das Pigment zeigte im Online-UV/VIS nicht die dreihügelige Struktur des Spektrums von Rubixanthins, sondern das typische einhügelige Spektrum der Ketocarotinoide. Die Menge an Rubixanthin war in der induzierten Probe nach 45 Minuten geringer als zum Startzeitpunkt. Aufgrund von Vergleichen mit Spektren aus der Literatur (Britton et al., 2004) sowie der Retentionszeit, wurde der Peak als Keto-Rubixanthin identifiziert. Die Ergebnisse konnten in allen drei Wiederholungsmessungen beobachtet werden.

Es wurden auch Experimente mit einem von mir hergestellten Rubixanthin produzierenden Bakterienstamm (Kapitel 3.3.1.3) durchgeführt. Da die Aussage der Ergebnisse der Aussage aus dem Versuch mit dem Zeaxanthin produzierenden Bakterienstamm entsprach, werden die Daten an dieser Stelle nicht gesondert angeführt.



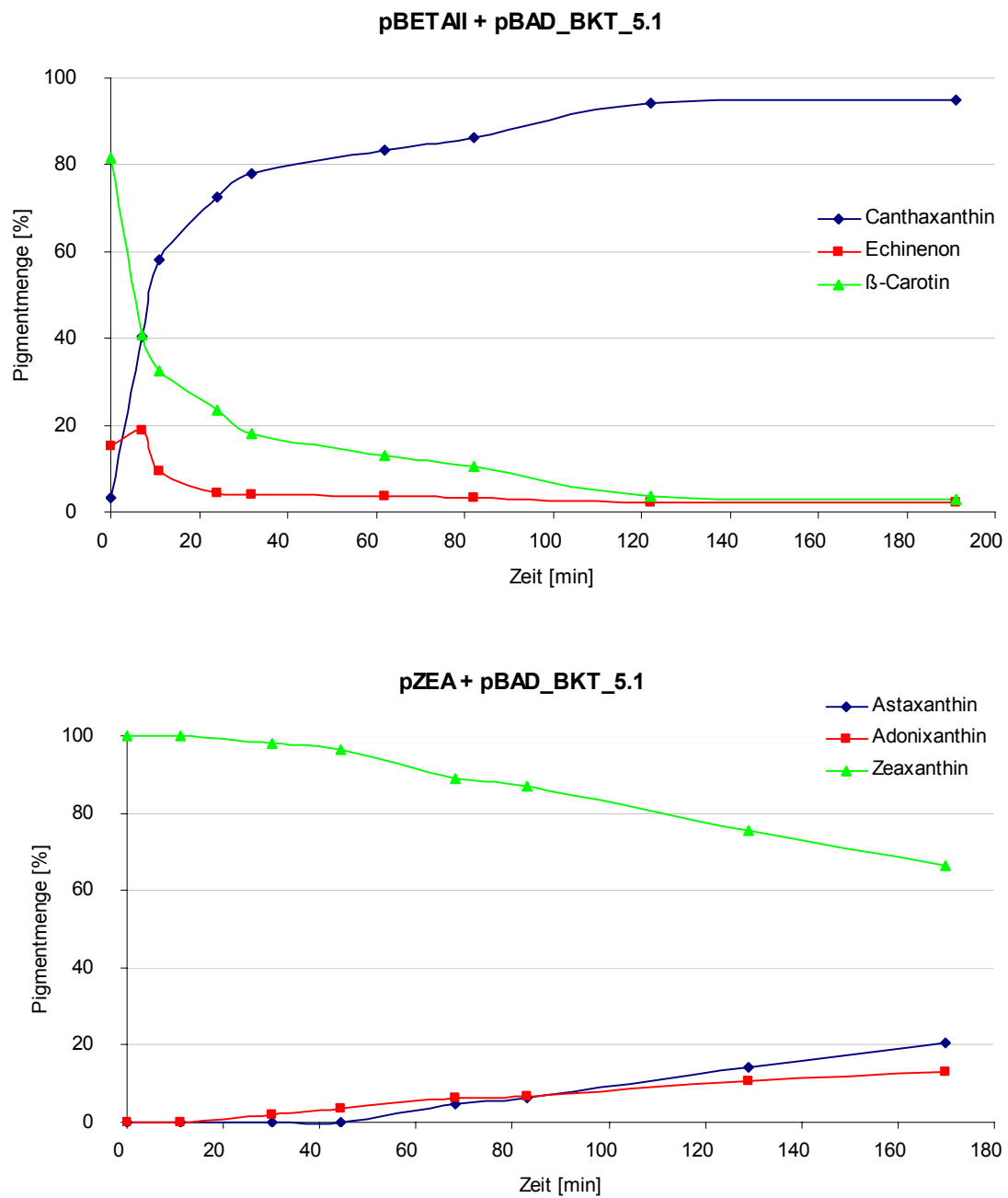


**Abb. 58** Ergebnis der heterologen Expression der CrBKT in Zeaxanthin produzierenden Top10-Zellen. Im oberen Diagramm sind die Zusammensetzung des Gesamtpigmentgehalts zum Startzeitpunkt der Induktion und nach 45 Minuten mit und ohne Induktion sowie die OD600 der Bakterienkulturen dargestellt. Im unteren Diagramm ist die Pigmentzusammensetzung der jeweiligen Proben noch einmal unter Angabe der Fehlerbalken angeführt. Die Datengrundlage bildeten drei Wiederholungsmessungen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 28 °C, die Induktion mit 0,2% Arabinose.

### 3.3.2.3. Die Aktivität der CrBKT-pBAD in $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin produzierenden Top10-Zellen im Vergleich

Um einen Eindruck zu erhalten, ob die BKT aus *C. reinhardtii* besser  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin umsetzt, wurde das Konstrukt pBAD\_CrBKT\_5.1 in  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin produzierenden Bakterienstämmen getestet, wobei zu mehreren Zeitpunkten Proben genommen wurden. In der Abb. 59 sind die Ergebnisse dargestellt. Zum Startzeitpunkt der Induktion mit 0,04% Arabinose betrug die  $\beta$ -Carotinkonzentration in den  $\beta$ -Carotin produzierenden Zellen 80% der Gesamtcarotinoidmenge. Die OD600 lag bei 1,3 und der Versuch wurde bei 27 °C durchgeführt. Bereits nach 20 Minuten war der Anteil von Canthaxanthin von 3% auf über 60% angestiegen. Die Gesamtpigmentmenge stieg in diesem Zeitraum nur um 10% an. Zu Beginn der Induktion war zunächst ein Anstieg der Echinenonkonzentration zu beobachten. Bereits nach 7 Minuten hatte sie schon wieder abgenommen und lag unter der Ausgangsmenge bei Induktionsstart. Die Mengen an  $\beta$ -Carotin und Echinenon näherten sich im Zeitverlauf bis 180 Minuten asymptotisch der X-Achse, während die Menge an Canthaxanthin einem Maximum zustrebte.

Die Induktion der BKT in den Zeaxanthin produzierenden Zellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen. Zum Startzeitpunkt des Versuches lag die OD600 ebenfalls bei 1,3. Astaxanthin und Adonirubin waren bei Induktionsstart nicht vorhanden. Die Menge an Adonixanthin stieg im Zeitverlauf nach der Induktion zunächst schneller an als die Menge an Astaxanthin, wurde aber dann von Astaxanthin überholt. Im Zeitverlauf fiel die Menge an Zeaxanthin immer mehr unter den Wert der Anfangskonzentration. Nach 170 Minuten machte die Menge an Astaxanthin 20% der Menge von Zeaxanthin und Adonirubin aus. Insgesamt verlief die Synthese von Astaxanthin im Bakterienversuch deutlich langsamer als die Synthese von Canthaxanthin.



**Abb. 59** Die heterologen Expression der BKT im Verlauf der Zeit. Im oberen Diagramm ist die Änderung der Pigmentzusammensetzung während der Expression des Konstruktes pBAD\_BKT\_5.1 bei 27 °C in  $\beta$ -Carotin produzierenden *E. coli*-Zellen bei Induktion mit 0,04% Arabinose dargestellt, unten die Induktion von Zeaxanthin produzierenden *E. coli*-Zellen mit 0.04% Arabinose unter identischen Versuchsbedingungen.

### 3.3.2.4. Funktionstest der BKT in $\alpha$ -Carotin produzierenden Top10-Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob die BKT auch Substrate zu ketolieren vermag, die vom  $\alpha$ -Carotin abgeleitet sind, wurde das Konstrukt pBAD\_BKT\_5.1 in einem  $\alpha$ -Carotin produzierender Bakterienstamm verwendet. In der Abb. 60 ist der potentielle Reaktionsweg für diesen Versuch dargestellt. Sollte die Reaktion positiv verlaufen, würde die BKT das  $\alpha$ -Carotin am C-Atom 4 im  $\beta$ -Iononring zu 4-Keto- $\alpha$ -Carotin ketolieren. Im Bakterientest sollten die beiden Pigmente bei einer positiven Reaktion nachgewiesen werden können. Eine weitere Frage war, ob auch der  $\epsilon$ -Iononring des Moleküls ketoliert werden kann, der ein Isomer des  $\beta$ -Iononrings ist und sich nur in der Stellung der Doppelbindung unterscheidet.

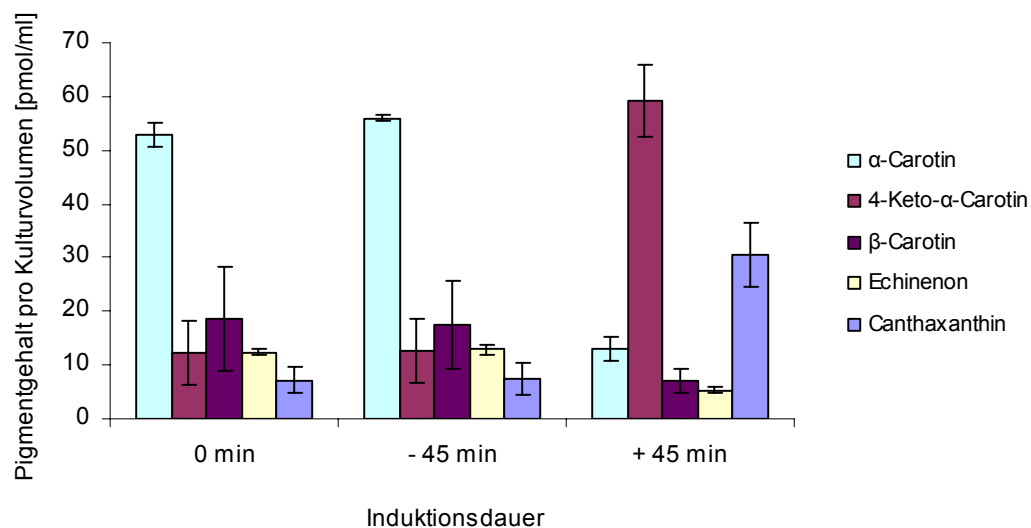
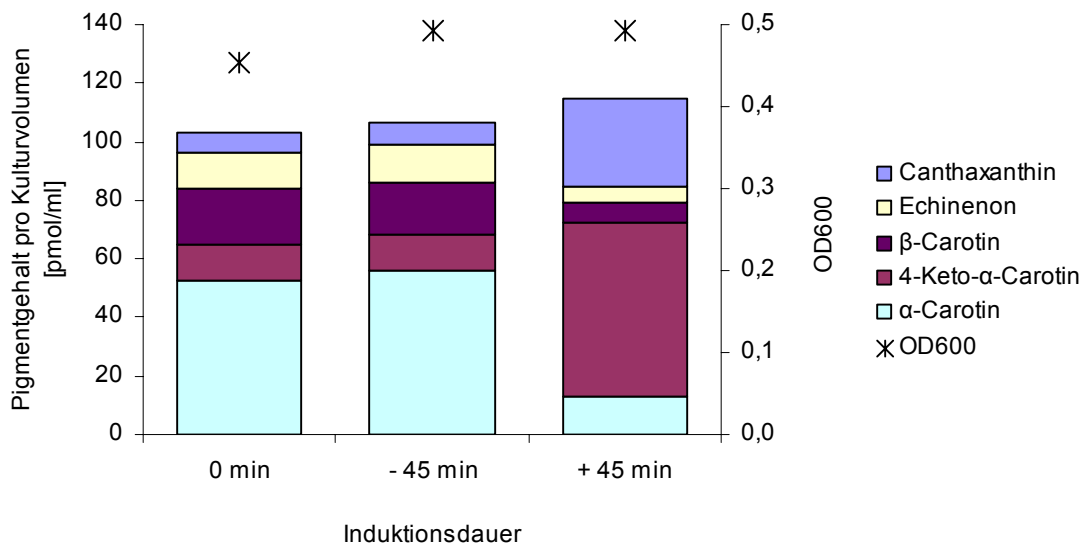


**Abb. 60** Schema der erwarteten Ketolierung von  $\alpha$ -Carotin zu 4-Keto- $\alpha$ -Carotin mit einer Ketogruppe an C-Atom 4 durch das Enzym BKT aus *C. reinhardtii*.

Der Versuch wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie die vorgenannten Versuche mit den  $\beta$ -Carotin bzw. Zeaxanthin produzierenden Stämmen. Im  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstamm war neben  $\alpha$ -Carotin auch noch  $\beta$ -Carotin zu finden. Das zeigte sich auch in dem hier vorliegenden Versuch zum Startzeitpunkt, bei dem 18%  $\beta$ -Carotin und 51%  $\alpha$ -Carotin detektiert wurden (Abb. 61). 45 Minuten nach der Induktion enthielt die induzierte Probe einen 4-Keto- $\alpha$ -Carotin Anteil von durchschnittlich 51%. Das Pigment wurde vorläufig auf Grund des Spektrums (vgl. Anhang A.9) und der verkürzten Retentionszeit identifiziert. Der Anteil von Canthaxanthin in der induzierten Probe lag bei 26%. Die Pigmente  $\beta$ -Carotin mit 6%,  $\alpha$ -Carotin mit 11% und Echinenon mit 5% machten zusammen weniger als  $\frac{1}{4}$  aus.

In der nichtinduzierten Probe hingegen nahm  $\alpha$ -Carotin mit 53% den größten Pigmentanteil ein. Während der 45-minütigen Induktionsdauer stieg der Pigmentgehalt nur leicht an. Der Unterschied zwischen dem Pigmentgehalt der induzierten Proben bei 45 Minuten gegenüber den Proben zum Startzeitpunkt lag bei durchschnittlich 12%, der Unterschied in der OD600 bei 8%. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei Wiederholungsmessungen.

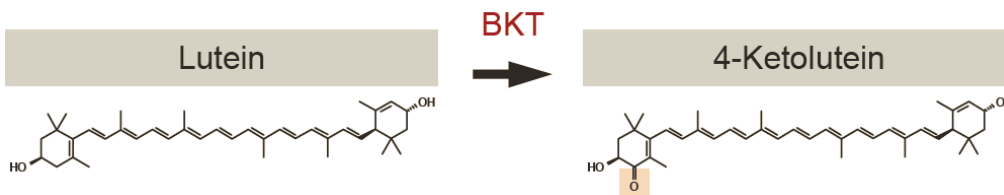




**Abb. 61** Ergebnis der heterologen Expression der CrBKT in  $\alpha$ -Carotin produzierenden Top10-Zellen. Im oberen Diagramm sind die Zusammensetzung des Gesamtpigmentgehalts zum Startzeitpunkt der Induktion und nach 45 Minuten mit und ohne Induktion sowie die OD600 der Bakterienkulturen dargestellt. Im unteren Diagramm ist die Pigmentzusammensetzung der jeweiligen Proben noch einmal unter Angabe der Fehlerbalken angeführt. Die Datengrundlage bildeten drei Wiederholungsmessungen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 28 °C, die Induktion mit 0,2% Arabinose.

### 3.3.2.5. Funktionstest der CrBKT-pBAD in Lutein produzierenden Top10-Zellen

Die Abb. 62 zeigt ein Schema der erwarteten Ketolase-Reaktion, falls das Enzym BKT aus *C. reinhardtii* auch Lutein als Substrat akzeptiert. In diesem Fall sollte das Enzym das Pigment Lutein, welches in mit pLUTEIN transformierten Top10-Zellen gebildet wird, durch Einfügen einer Ketogruppe an der Position 4 zu 4-Ketolutein umwandeln. In einem Pigmentextrakt sollten bei einem aktiven Enzym das Substrat und das Endprodukt zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion nachweisbar sein.



**Abb. 62** Schema der erwarteten Ketolase-Reaktion durch das Enzym BKT aus *C. reinhardtii*, ausgehend von Lutein zu 4-Ketolutein mit einer Ketogruppe an der Position 4.

Der Test erfolgte analog zu den vorhergehend beschriebenen Versuchen. Die Anzucht der Lutein produzierenden Top10-Zellen mit dem pBAD\_CrBKT\_5.1-Konstrukt erfolgte bei 28 °C, dann wurde der Ansatz gesplittet. Einer der beiden Ansätze wurde mit 0,2% Arabinose induziert, der zweite Ansatz diente als Kontrolle. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und nach dem Standardprotokoll aufgeschlossen und extrahiert. Die Ergebnisse wurden in drei Wiederholungsmessungen verifiziert.

Bereits zum Startzeitpunkt der Induktion war die Pigmentzusammensetzung sehr komplex. Die Zellen enthielten einen durchschnittlichen Anteil von 24% Lutein und 21% Zeaxanthin (Abb. 63). Daneben fanden sich 24% Zeinoxanthin und 14% eines Luteinderivats. Mengen von jeweils etwa 5 % wurden von einem 4-Ketoluteinderivat, 4-Ketozeinoxanthin und Lycopin detektiert. Die Pigmentidentifikation von Lutein, Zeaxanthin, und Lycopin erfolgte über den Vergleich mit Standards. Die übrigen Pigmente wurden anhand ihrer UV/VIS-Spektren und Retentionszeiten vorläufig identifiziert.

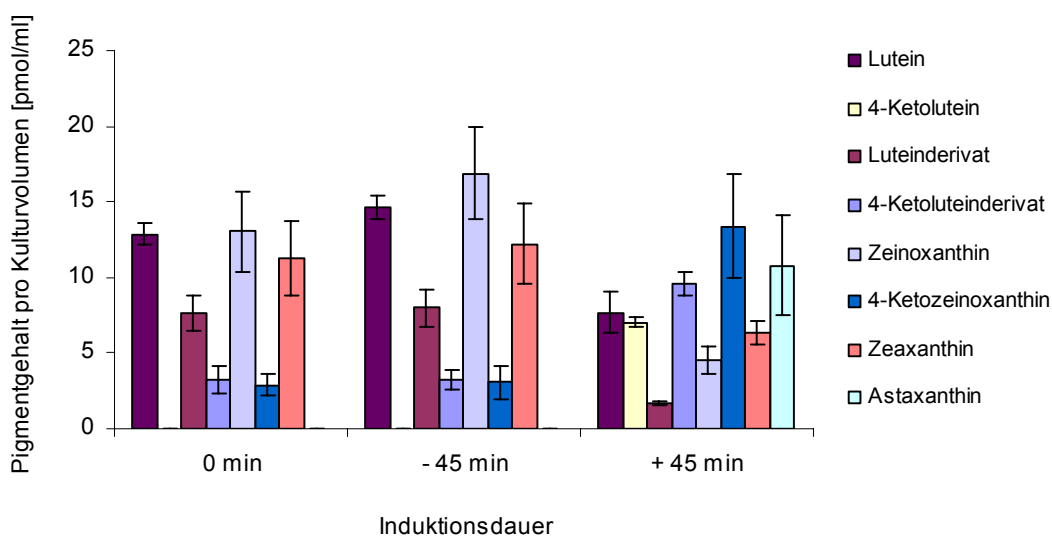
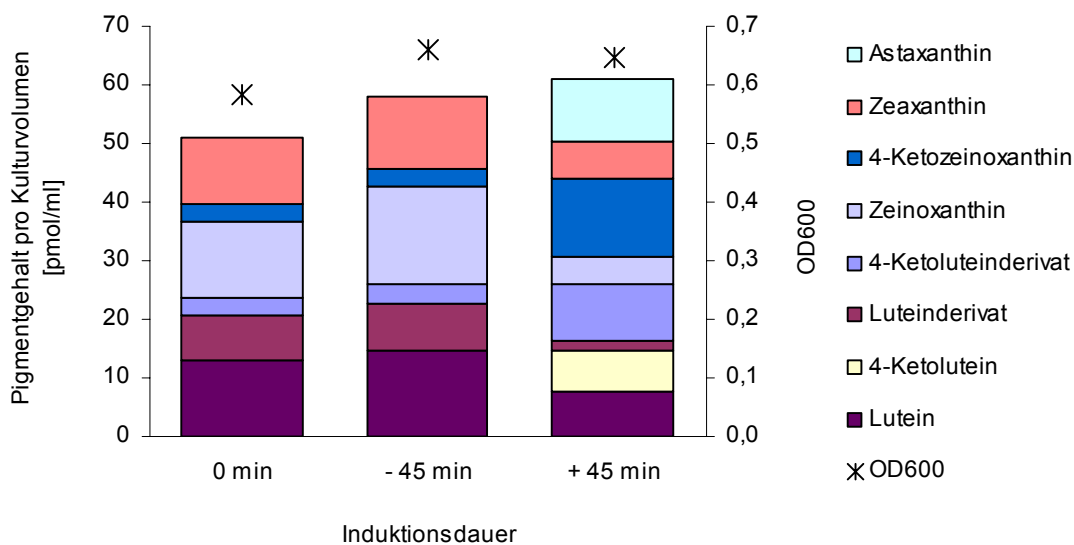
Während der 45-minütigen Induktion veränderte sich die Zusammensetzung der Pigmente. Die OD600 und der Pigmentgehalt stiegen um durchschnittlich 12% bzw. 16% an. Zum Startzeitpunkt lag der Gehalt an Lutein in den Kulturen bei 12,9 pmol/ml. Nach 45 Minuten lag der Anteil in der nichtinduzierten Probe bei 14,6 pmol/ml, in der induzierten Probe war er auf 7,7 pmol/ml gefallen. In der induzierten Probe erhöhte sich der Pigmentanteil von 4-Ketolutein von 0 auf 7,1 pmol/ml (Abb. 32).

Die Menge an 4-Ketozeinoxanthin erhöhte sich von 2,9 pmol/ml zum Startzeitpunkt auf 13,4 pmol/ml in der induzierten Probe und die Menge von Zeinoxanthin fiel von 13,9 pmol/ml auf

4,6 pmol/ml. Außerdem stieg die Konzentration von Astaxanthin in der induzierten Probe in 45 Minuten von 0 pmol/ml auf 10,8 pmol/ml an, die Konzentration von Zeaxanthin fiel von 11,2 pmol/ml auf 6,3 pmol/ml.

Darüber hinaus ist auch das potentielle Luteinderivat zu nennen, dessen Konzentration von 7,7 pmol/ml zum Startzeitpunkt auf 1,7 pmol/ml sank, während sich die Konzentration des potentiellen 4-Ketoluteinderivats von 3,2 pmol/ml auf 9,6 pmol/ml erhöhte.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Menge an Lutein sich in der induzierten Kultur verringert und 4-Ketolutein akkumuliert.



**Abb. 63** Ergebnis der heterologen Expression der CrBKT in Lutein produzierenden Top10-Zellen. Im oberen Diagramm sind die Zusammensetzung des Gesamtpigmentgehalts zum Startzeitpunkt der Induktion und nach 45 Minuten mit und ohne Induktion sowie die OD600 der Bakterienkulturen dargestellt. Im unteren Diagramm ist die Pigmentzusammensetzung der jeweiligen Proben noch einmal unter Angabe der Fehlerbalken angeführt. Die Datengrundlage bildeten drei Wiederholungsmessungen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 28 °C, die Induktion mit 0,2% Arabinose.

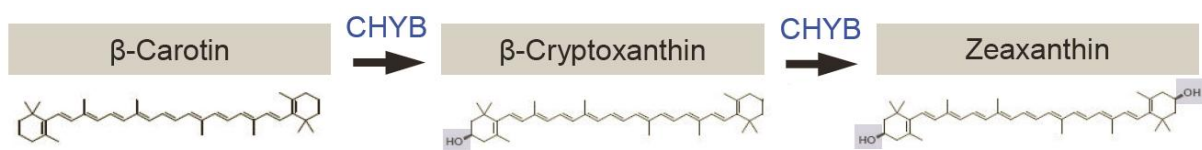
### 3.3.3. Funktionelle Charakterisierung der Carotinoid-Hydroxylasen aus *C. reinhardtii*

#### 3.3.3.1. Die Carotinoidhydroxylase- $\beta$ (CHYB)

##### Funktionstest der CHYB in $\beta$ -Carotin produzierenden XL1-BLUE-Zellen

In *C. reinhardtii* ist eine potentielle Carotinoid-Hydroxylasen (CHYB) enthalten, die homolog zu der CHYB aus *A. thaliana* ist (Lohr et al. 2005). Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit gelang es mir, die CHYB aus *C. reinhardtii* aus einer ESP-Phagenbank zu amplifizieren, in den pBAD Expressionsvektor zu klonieren und im Bakteriensystem zu testen (Bauch, 2007). Die Versuche wurden hier mit einem neuen  $\beta$ -Carotin produzierenden Bakterienstamm wiederholt, da sich während der vorliegenden Arbeit herausstellte, dass der Stamm eine unerwartete genetische Ausstattung aufwies und daher für die Überprüfung der CHYB-Aktivität ungeeignet war. Das Konstrukt CHYB wurde im Folgenden in verschiedenen carotinogenen Bakterien getestet.

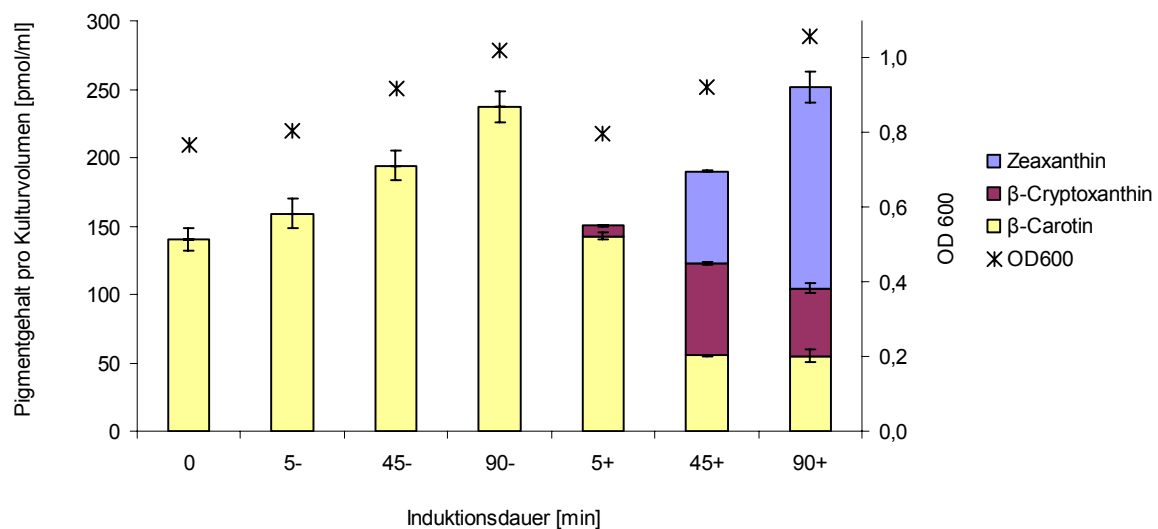
In der Abb. 64 ist der potentielle Biosyntheseweg ausgehend von  $\beta$ -Carotin über  $\beta$ -Cryptoxanthin zu Zeaxanthin dargestellt. Bei einer erfolgreichen Reaktion sollten sowohl das Substrat, als auch das Zwischenprodukt und das Endprodukt in den Bakterien nachgewiesen werden.



**Abb. 64** Schema der erwarteten Hydroxylase-Reaktion durch das Enzym CHYB aus *C. reinhardtii*, ausgehend von  $\beta$ -Carotin über  $\beta$ -Cryptoxanthin mit einer Hydroxygruppe an Position 3, zu Zeaxanthin mit Hydroxygruppen an den Positionen 3 und 3'.

Zur funktionellen Charakterisierung der CHYB wurde das Konstrukt pBAD\_CHYB in XL1-Blue-Zellen mit dem konstitutiv aktiven Plasmid pBETA II zur  $\beta$ -Carotin-Produktion getestet. In den Bakterienkulturen konnte zum Startzeitpunkt ein  $\beta$ -Carotin-Gehalt von 140 pmol/ml nachgewiesen werden. In allen nicht induzierten Proben wurden weder  $\beta$ -Cryptoxanthin noch Zeaxanthin nachgewiesen. Bereits 5 Minuten nach der Induktion wurde in der induzierten

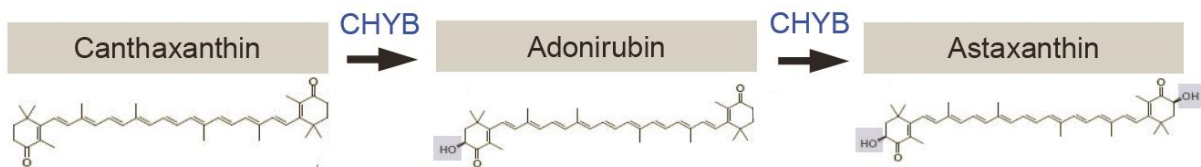
Probe eine geringe Konzentration von  $\beta$ -Cryptoxanthin detektiert. Nach 45 Minuten war die Konzentration von  $\beta$ -Carotin in den induzierten Proben auf durchschnittlich 55 pmol/ml gesunken. Dafür lag die Zeaxanthinkonzentration bei 68 pmol/ml und die Konzentration von  $\beta$ -Cryptoxanthin bei 67 pmol/ml. Die Menge der drei Pigmente steigerte sich in den 45 Minuten insgesamt um 50 pmol/ml. Nach 90 Minuten konnte in den induzierten Proben eine noch höhere Konzentration an Zeaxanthin detektiert werden. Sie lag bei 147 pmol/ml.



**Abb. 65** Ergebnis der heterologen Expression der CrCHYB in  $\beta$ -Carotin produzierenden XL1-BLUE-Zellen. Im Diagramm ist die Zusammensetzung des Gesamtpigmentgehalts zum Startzeitpunkt der Induktion und nach 45 und 90 Minuten mit und ohne Induktion sowie die OD600 der Bakterienkulturen dargestellt. Die Datengrundlage bildeten drei Wiederholungsmessungen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 28 °C, die Induktion mit 0,2% Arabinose.

### Funktionstest der CHYB in Canthaxanthin produzierenden XL1-BLUE-Zellen

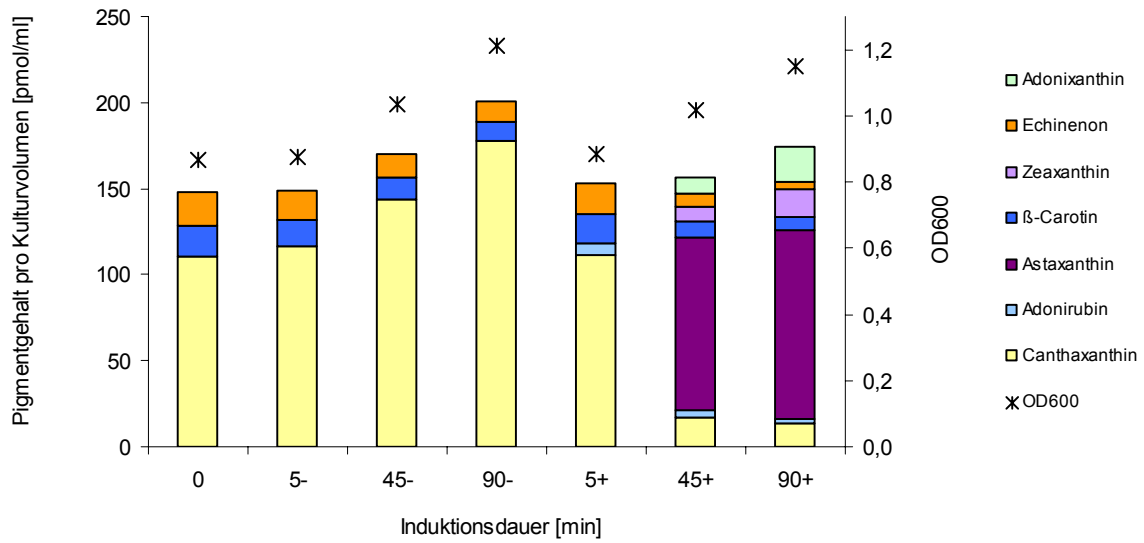
Um der Frage nachzugehen, ob auch Canthaxanthin als Substrat der CHYB dienen kann, wurde die CHYB in Form des Konstruktes pBAD\_CrCHYB in Canthaxanthin produzierenden Bakterien getestet. In der Abb. 64 ist der potentielle Biosyntheseweg ausgehend von Canthaxanthin über Adonirubin zu Astaxanthin dargestellt. Bei einer erfolgreichen Reaktion sollten sowohl das Substrat, als auch das Zwischenprodukt und das Endprodukt in den Bakterien nachgewiesen werden können.



**Abb. 66** Schema der erwarteten Hydroxylase-Reaktion durch das Enzym CHYB aus *C. reinhardtii*, ausgehend von Canthaxanthin über Adonirubin mit einer Hydroxygruppe an Position 3, zu Astaxanthin mit Hydroxygruppen an den Positionen 3 und 3'.

In der Abb. 67 ist das Ergebnis der Bakterienversuche dargestellt. Zum Startzeitpunkt setzte sich der Pigmentextrakt aus 75% Canthaxanthin, 13% Echinenon und 12%  $\beta$ -Carotin zusammen. Die Konzentration von Canthaxanthin lag bei 110 pmol/ml. 5 Minuten nach der Induktion wurde eine geringe Menge Adonirubin detektiert. Nach 45 Minuten war die Menge an Canthaxanthin in den induzierten Proben auf 17 pmol/ml gefallen. Dafür lag die Astaxanthinkonzentration bei 101 pmol/ml und hielt damit einen Anteil von 65%. Im gleichen Zeitraum stieg die Pigmentmenge insgesamt um 6% an. Die OD600 stieg um 17% an (Abb. 37).

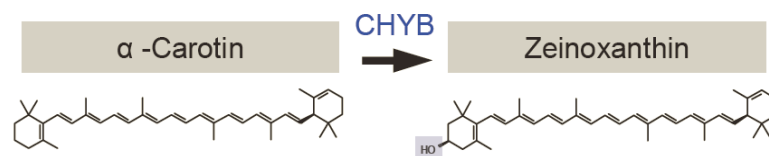
90 Minuten nach der Induktion wurde eine Astaxanthinkonzentration von 109 pmol/ml gemessen. Der Anteil von Astaxanthin lag bei 63%. Der restliche Pigmentanteil setzte sich aus 8% Canthaxanthin, 1% Adonirubin, 9% Zeaxanthin, 11% Adonixanthin, 4%  $\beta$ -Carotin und 3% Echinenon zusammen.



**Abb. 67** Ergebnis der heterologen Expression der CrCHYB in Canthaxanthin produzierenden XL1-Blue-Zellen. Im Diagramm ist die Zusammensetzung des Gesamtpigmentgehalts zum Startzeitpunkt der Induktion und nach 45 und 90 Minuten mit und ohne Induktion sowie die OD600 der Bakterienkulturen dargestellt. Die Datengrundlage bildeten drei Wiederholungsmessungen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 28 °C, die Induktion mit 0,2% Arabinose.

### Funktionstest der CHYB in $\alpha$ -Carotin produzierenden Top10-Zellen

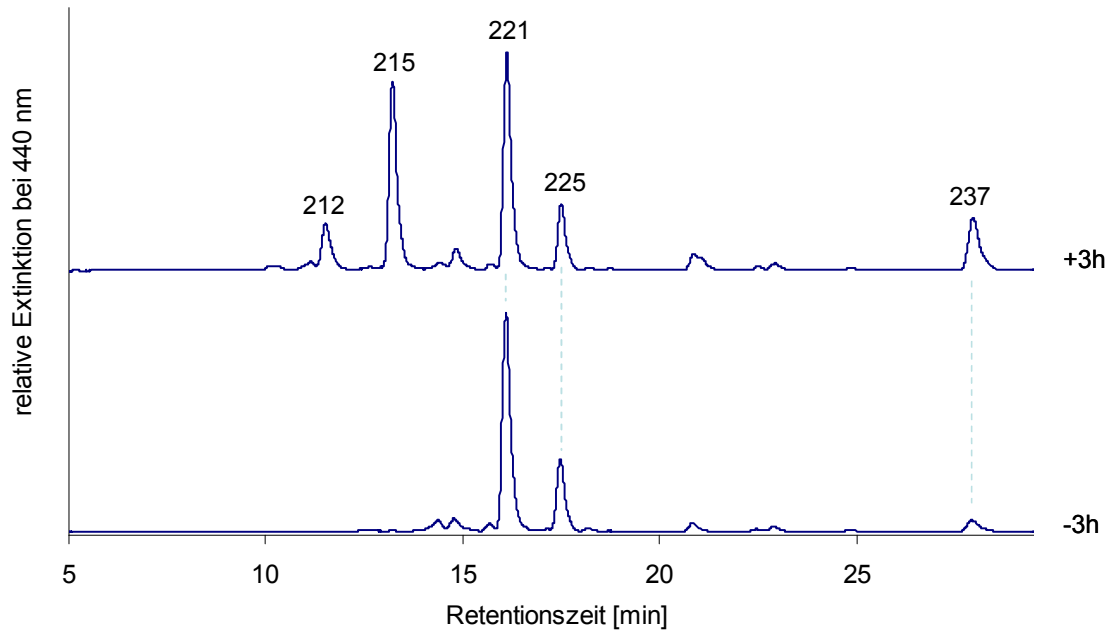
Bei der Aufklärung des Biosyntheseweges der Ketocarotinoide in *C. reinhardtii* stellte sich ebenfalls die Frage, ob die CHYB den  $\beta$ -Iononring des  $\alpha$ -Carotins zu hydroxylieren vermag, oder ob der  $\epsilon$ -Iononring an der gegenüberliegenden Seite des Moleküls zum Ausschluss des Moleküls als Substrat führt. Außerdem sollte geprüft werden, ob die CHYB analog zur bakteriellen CrtZ nicht nur den  $\beta$ -Iononring des  $\alpha$ -Carotins zu hydroxylieren vermag, sondern möglicherweise auch das Isomer des  $\beta$ -Iononrings, den  $\epsilon$ -Iononring, der sich nur in der Stellung der Doppelbindung unterscheidet. In diesem Falle würde Lutein entstehen. Die Abb. 64 zeigt den potentiellen Biosyntheseweg ausgehend von  $\alpha$ -Carotin zu Zeinoxanthin. Bei einer erfolgreichen Reaktion sollten sowohl das Substrat als auch das Endprodukt in den Bakterien nachgewiesen werden können.



**Abb. 68** Schema der erwarteten Hydroxylase-Reaktion durch das Enzym CHYB aus *C. reinhardtii*, ausgehend von  $\alpha$ -Carotin zu Zeinoxanthin mit einer Hydroxygruppe an Position 3.

Zum Nachweis wurde das Konstrukt pBAD\_CrCHYB in  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterien exprimiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 28 °C und die Induktion wurde mit 0,2% Arabinose vorgenommen. In der nicht induzierten Probe machten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin den größten Anteil der Pigmentzusammensetzung aus. In der induzierten Probe konnten neben  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin auch Zeinoxanthin und Zeaxanthin detektiert werden. Lutein wurde nicht gefunden.

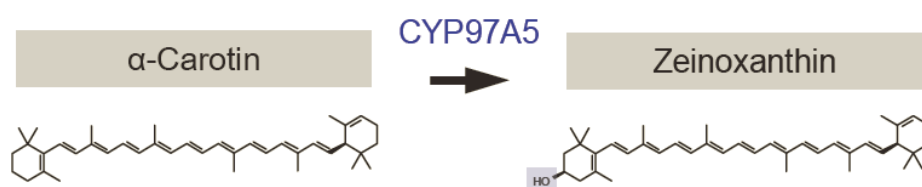




**Abb. 69** Chromatogramm von Pigmentextrakt aus Top10-Zellen mit den Plasmiden pALPHA und pBAD\_CrCHYB. Die Induktion erfolgte mit 0,2% Arabinose für 3 h. Oben ist die induzierte Probe (+3h) gezeigt, darunter die nicht induzierte Probe (-3h). In den Chromatogrammen konnten die Pigmente Lycopin (237),  $\beta$ -Carotin (225),  $\alpha$ -Carotin (221), Zeinoxanthin (215) und Zeaxanthin (212) identifiziert werden. Verwendet wurde die HPLC-Methode 3.

### 3.3.3.2. Die Cytochrom P450-Carotinoid-Hydroxylase CYP97A5 aus *C. reinhardtii*

Lohr (2009) postulierte auf Grund von Sequenzanalysen neben der CHYB weitere Carotinoidhydroxylasen in *C. reinhardtii*. Er ging davon aus, dass die CYP97A5 den  $\beta$ -Iononring des  $\alpha$ -Carotins zu hydroxylieren vermag, da das Gen zum CYP97A3-Gen von *A. thaliana* ortholog ist, das für eine Cytochrom P450-Carotinoid- $\beta$ -Ring-Hydroxylase kodiert. Die funktionelle Expression der Enzyme der Cytochrom P450-Familie stellt eine besondere Herausforderung dar. In der Abb. 70 ist die potentiell durch CYP97A5 katalysierte Reaktion von  $\alpha$ -Carotin zu Zeinoxanthin dargestellt.

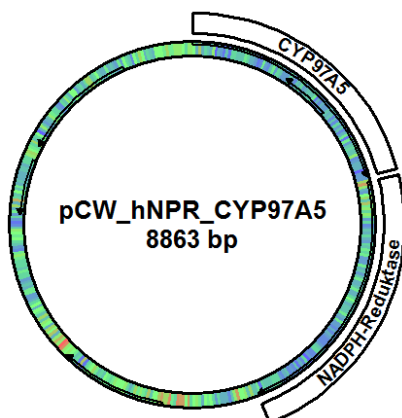


**Abb. 70** Schema der erwarteten Hydroxylase-Reaktion durch das Enzym CYP97A5 aus *C. reinhardtii*, ausgehend von  $\alpha$ -Carotin zu Zeinoxanthin mit einer Hydroxygruppe an Position 3.

Zunächst wurde das CYP97A5-Gen aus cDNA von Gameten des *C. reinhardtii*- Stammes cc620 mittels der außen liegenden Primer CrCYP97A5\_a1p und CrCYP97A5\_e1m, sowie den weiter innen liegenden Primern CrCYP97A5\_a1p und CrCYP97A5\_e3m in einer Nested PCR amplifiziert und in den pBAD-Vektor kloniert. Der hohe GC-Gehalt des Templates und die Länge des Gens von 1,8 kB erschwerten die Amplifikation. Daher waren mehrere Anläufe nötig, um das Gen weitgehend ohne Basenaustausch zu amplifizieren. Verwendung fanden verschiedene Polymerasen. Die PCR-Produkte wurden in den pBAD-Topo-TA-Vektor kloniert. Da nur eine minimale Aktivität des Konstrukts pBAD\_CYP97A5 in den  $\beta$ -Carotin produzierenden Bakterien nachgewiesen werden konnte, wurde das Konstrukt mittels PCR mit den Schnittstellen NdeI und XbaI versehen (Primer: CrCYP97A\_a1m\_NdeI und CrCYP97A\_e1m\_XbaI) und über diese in den von Prof. Dr. Heribert Warzecha (Technische Universität Darmstadt) zur Verfügung gestellten pCW-Vektor eingebracht (Abb. 71). Es handelt sich um einen binären Vektor der neben dem zu testenden Gen noch eine humane Cytochrom-P450-NADPH-Oxidoreduktase beinhaltet. Ein nicht konservierter N-terminaler Bereich der CYP97A5 im Alignment mit CYP97A-Sequenzen verschiedener Spezies und die Vorhersage der Programme ChloroP und Target P bestätigten die Hypothese, dass das kerncodierte Protein eine Transitsequenz trägt. Laut ChloroP umfasst dieses Sequenzstück

37 AS Aminosäuren. Um das mature Protein testen zu können, wurde das Präprotein N-Terminal um 37 AS verkürzt.

Die Expression des resultierenden Plasmids pCW\_CYP97A5 in  $\beta$ -Carotin produzierenden Bakterien erfolgte bei 28 °C in einem modifizierten TB-Medium mit Zusatz einer Trace-Elements Lösung,  $\delta$ -ALA und Thyamin in Anlehnung an Pritchard et al. (2006). Auch unter diesen Bedingungen konnten zunächst nur minimale Produktmengen nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt enthielt das Gen an der Position 1594 jedoch noch eine Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch an der Position 532 von Alanin zu Threonin führte. Die Reparatur dieser Mutation und die sich anschließenden Expressionsstudien zu dem Konstrukt in den verschiedenen Carotinoid produzierenden Bakterien wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Jennifer Elbers (2011) unter meiner Anleitung durchgeführt. In der Abb. 73 ist ein HPLC-Chromatogramm zum Test des von Frau Elbers hergestellten Konstrukts pCW\_hNPR\_CYP97A5 im  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstamm dargestellt. Nach achtstündiger Induktion mit IPTG nahmen die Pigmente Zeinoxanthin,  $\beta$ -Carotin und  $\delta$ -Carotin den größten Anteil in der Pigmentzusammensetzung ein. Weitere Versuche sind Elbers (2011) zu entnehmen.



**Abb. 71** Aufbau des Vektors pCW\_hNPR\_CYP97A5. Der Vektor enthält das funktionell zu charakterisierende Gen CYP97A5 aus *C. reinhardtii*. Daneben enthält der Vektor noch eine humane Cytochrom-P450-NADPH-Oxidoreduktase, die mit dem Gen aus *C. reinhardtii* koexprimiert wird.

### 3.3.3.3. Die Cytochrom P450-Carotinoid-Hydroxylase CYP97C3 aus *C. reinhardtii*

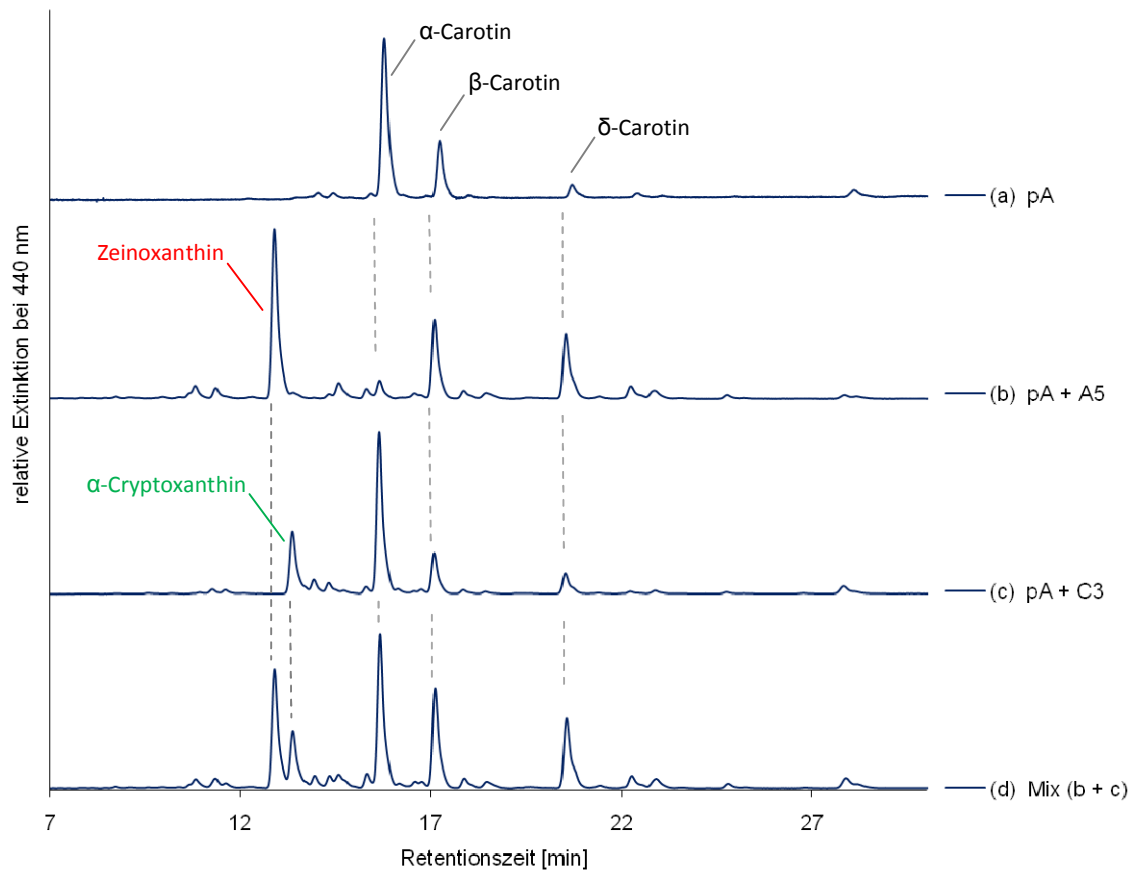
Lohr (2009) postulierte für das CYP97C3Gen aus *C. reinhardtii* ebenfalls eine Beteiligung an der Hydroxylierung von Carotinoiden, da es zur CYP97C1 von *A. thaliana* ortholog ist, bei der es sich um eine Carotinoid- $\epsilon$ -Ring-Hydroxylase handelt. In der Abb. 72 wird die potentiell durch CYP97A5 katalysierte Hydroxylierung von  $\alpha$ -Carotin zu  $\alpha$ -Cryptoxanthin gezeigt.



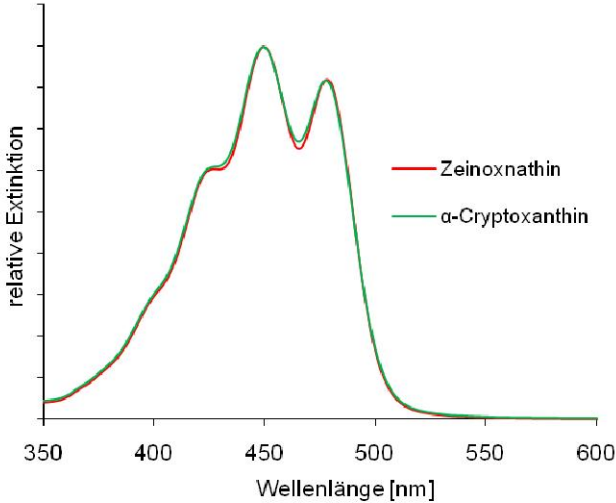
Abb. 72 Schema der erwarteten Hydroxylase-Reaktion durch das Enzym CYP97C3 aus *C. reinhardtii*, ausgehend von  $\alpha$ -Carotin zu  $\alpha$ -Cryptoxanthin mit einer Hydroxygruppe an Position 3.

Auch die Amplifikation des CYP97C3-Gens aus cDNA der *C. reinhardtii* Stämme cc620 und cc621 erwies sich als schwierig, so dass für die Amplifikation waren mehrere Anläufe notwendig waren. Letztendlich konnte das Gen mit einer Nested-PCR aus einem cDNA-Gemisch der zwei Stämme mit den Primern CrCYP97C3\_a2p und CrCYP97e1m, sowie den weiter innen liegenden Primern CrCYP97C3\_a3p und CrCYP97e2m amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wurde in den pBAD Topo TA-Vektor kloniert. Trotz mehrerer Wiederholungen konnte die Sequenz nicht fehlerfrei amplifiziert werden. Durch eine Kombination von zwei Klonen konnte eine fehlerfreie Sequenz hergestellt werden. Die Reparatur und die sich anschließenden Expressionsstudien im pCW-Vektor führte Elbers (2011) im Rahmen ihrer Diplomarbeit unter meiner Anleitung durch. In der Abb. 73 ist ein HPLC-Chromatogramm zur funktionellen Charakterisierung der CYP97C3 mittels des von Elbers (2011) hergestellten Konstruktes pCW-hNPR-CYP97C3 in  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterien dargestellt. Nach achtstündiger Induktion mit IPTG war neben den auch in nicht-induzierten Zellen beobachteten Pigmenten  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin und  $\delta$ -Carotin ein weiterer Pigmentpeak zu detektieren. Es handelte sich um  $\alpha$ -Cryptoxanthin, das auf Grund des Spektrums und der Retentionszeit identifiziert werden konnte. Das HPLC-Chromatogramm in Abb. 73 (d), für das die in den Chromatogrammen (b) und (c) analysierten Pigmentextrakte gemischt wurden, verdeutlicht noch einmal, dass es mit der verwendeten HPLC-Methode möglich war, die beiden Konstitutionsisomere Zeinoxanthin und  $\alpha$ -Cryptoxanthin klar zu unterscheiden. Im Zeinoxanthin befindet sich die Hydroxygruppe an Position 3, bei  $\alpha$ -Cryptoxanthin an Position 3'. Die Absorptionsspektren der beiden Moleküle unterschieden sich nur minimal in ihrer Feinstruktur (Abb. 74). Weitere Tests zeigten, dass auf die hNPR im pCW-Vektor verzichtet

werden kann, ohne dass die Reaktion merklich langsamer abläuft. Es bleibt noch zu prüfen, inwieweit das komplexe Nährmedium für die Bakterien reduziert werden kann.



**Abb. 73** HPLC-Chromatogramme der heterologen Expression der CYP97A5 und CYP97C3 aus *C. reinhardtii* in  $\alpha$ -Carotin produzierenden Top10-Zellen. In Chromatogramm a) ist die Pigmentzusammensetzung des  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes dargestellt, in b) die Zusammensetzung des Gesamtpigmentgehalts von  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterien mit dem Konstrukt pCW\_hNPR\_CYP97A5 nach achtstündiger Induktion mit IPTG, in c) die Zusammensetzung des Gesamtpigmentgehalts von  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterien mit dem Konstrukt pCW\_hNPR\_CYP97C3 nach achtstündiger Induktion mit IPTG, und in (d) die Mischung der Pigmentextrakte aus (b) und (c). Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Methode 3 erstellt.



**Abb. 74** Die UV/VIS-Spektren von Zeinoxanthin und  $\alpha$ -Cryptoxanthin im Vergleich

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Biosynthese von Ketocarotinoiden in Grünalgen

#### 4.1.1. Verbreitung der Fähigkeit zur Synthese des bisher nur aus nur einer Grünalge beschriebenen Ketocarotinoids 4-Ketolutein innerhalb der Gruppe der Grünalgen

Die Untersuchung der Grünalgen *C. reinhardtii*, *F. tuberosa*, *M. zofingiensis* (auch gebrauchtes Synonym *C. zofingiensis*), *S. rubescens* und *H. pluvialis* bestätigte zunächst, dass die reifen Dauerstadien, bei denen es sich um Aplanosporen und Zygoten handelte, Ketocarotinoide akkumulieren. Es gibt viele Arbeiten zur Akkumulation von Astaxanthin in *H. pluvialis*, da die Alge als Astaxanthinproduzent von kommerziellem Interesse ist. Auch von den Grünalgen *S. rubescens*, *F. tuberosa* und *M. zofingiensis* gibt es Studien zur Ketocarotinoidakkumulation im Dauerstadium (für *F. tuberosa* siehe Weber 1974, eine umfangreiche Auflistung findet sich im Review von Lemoine und Schoefs, 2010).

Es war bisher nicht bekannt, dass *C. reinhardtii* im Dauerstadium der Zygosporen Ketocarotinoide akkumulieren kann. Die Grünalge zeigt normalerweise bei Seneszenz durch Mangelernährung oder innerhalb des vegetativen Zellzyklusses nur stöchiometrische Veränderungen in der Carotinoidzusammensetzung, ohne dass neue Pigmentspezies gebildet werden (Czygan, 1968; Francis et al., 1975). Erst Werner (2011) konnte zeigen, dass reife *C. reinhardtii*-Zygosporen ein deutlich abweichendes Pigmentmuster aufweisen und insbesondere Ketocarotinoide akkumulieren. Darunter fand Werner (2011) die freien Pigmente Astaxanthin, Canthaxanthin, 4-Ketolutein sowie eine Reihe potentieller Ketocarotinoidester. Die hier vorliegenden Versuche zu *C. reinhardtii* bestätigten diesen Befund, und durch Verseifungs- und Reduktionsexperimente konnte die Anwesenheit der Ketocarotinoidester nachgewiesen werden.

Die untersuchten Dauerstadien der Grünalgen enthielten neben den auch in vegetativen Zellen vorkommenden Pigmenten als Sekundärcarotinoide die Pigmente Astaxanthin, Canthaxanthin, Adonirubin, Echinenon und 4-Ketolutein als freie Ketocarotinoide.

Auch in der Grünalge *S. rubescens* (SAG 5-95) konnte freies 4-Ketolutein nachgewiesen werden. Grewe (2009) identifizierte in der Untersuchung der Pigmentzusammensetzung von *S. rubescens* (SAG 5-95) mittels LC/MS kein 4-Ketolutein und keine 4-Ketoluteinacyl ester.

Damit stehen die hier beschriebenen Ergebnisse zunächst im Widerspruch zu denen von Grewe (2009). Aus diesem Grund wurde 4-Ketolutein in der hier vorliegenden Arbeit noch einmal speziell aus *S. rubescens* präpariert und dessen Identität mit den verschiedenen Nachweismethoden abgesichert. Der vermeintliche Widerspruch löst sich jedoch bei genauerer Betrachtung auf. In der Arbeit von Grewe (2009) auf Seite 54 wird der Peak 2, der zwischen Astaxanthin und Lutein läuft, als Adonixanthin identifiziert. Adonixanthin ist ein Konstitutionsisomer von 4-Ketolutein. Der molekulare Unterschied liegt in der Position einer Doppelbindung in einem der beiden Iononringe. Die Unterscheidung der beiden Pigmente kann mittels HPLC auf Grund einer unterschiedlichen Retentionszeit und des unterschiedlichen UV/VIS-Spektrums erfolgen (vgl. Anhang A.8 und A.9). Auch bei der Untersuchung der Massen im Massenspektrometer ergibt sich ein Unterschied zwischen den beiden Pigmenten. Bei der Ionisierung von 4-Ketolutein mittels APCI-Einheit entsteht ein Molekül mit der Masse von 565 m/z  $[M+H-H_2O]^+$  (Britton et al., 2004). Auch bei Lutein kommt es bei der Protonierung zur spontanen Abspaltung eines Wassermoleküls. Das Phänomen tritt auf, wenn der  $\epsilon$ -Iononring an der Position 3 hydroxyliert ist. Die Erklärung liefern die mesomeren Grenzstrukturen des resultierenden Ions. Das Molekül weist nach Abgabe von  $H_2O$  eine erhöhte Mesomeriestabilisierung auf, da das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem erweitert wird (Grewe, 2009). Bei den vom  $\beta$ -Carotin abgeleiteten Pigmenten ohne  $\epsilon$ -Iononring wie Echinenon und Canthaxanthin tritt das Phänomen nicht auf. Die gemessenen Massen entsprechen den theoretischen Massen von  $[M+H]^+$  (Young und Britton, 1993; Bjornland und Liaaen-Jensen, 1989). Folglich tritt dieses Phänomen auch nicht bei Adonixanthin auf. Bei Messungen mit der LC/APCI-MS wird für Adonixanthin in der Praxis die Masse von 583 m/z gemessen, was  $[M+H]^+$  entspricht (Nishida et al., 2005). Damit handelt es sich bei den Pigmenten aus den Dauerkulturen von *S. rubescens* von Grewe (2009) sehr wahrscheinlich nicht um Adonixanthin, sondern um das Konstitutionsisomer 4-Ketolutein, was die von Grewe gemessene Masse aus der LC/APCI-MS von 565,3 m/z  $[M+H-H_2O]^+$  bestätigt. Bei der Analyse der Ester kann man von einem vergleichbaren Sachverhalt ausgehen. Damit unterstützen die Daten der LC/APCI-MS-Analyse von Grewe (2009) unseren Befund von 4-Ketolutein in den Aplanosporen von *S. rubescens*.

Die Verseifungsexperimente in der hier vorliegenden Arbeit zeigten, dass der größte Teil der Ketocarotinoide nicht in freier Form, sondern mit Fettsäuren verestert vorlag.

Vier der fünf hier vorgestellten Grünalgenarten enthielten bedeutende Mengen 4-Ketolutein. Der Anteil reichte von 18% bis zu 53% des Gesamtcarotinoidgehaltes in den reifen Dauerstadien. Die Pigmente Astaxanthin und 4-Ketolutein machten bei fast allen Algen den



größten Pigmentanteil aus. Nur in den *H. pluvialis*-Proben wurde ein 4-Ketolutein-Anteil von höchstens 4% detektiert.

4-Ketolutein wurde bisher nur in einer Grünalgenart (Weber, 1975) beschrieben. Es ist davon auszugehen, dass das 4-Ketolutein (Synonym Fritschiellaxanthin) in den anderen bekannten Ketocarotinoid bildenden Grünalgen bisher mit einem anderen Pigment verwechselt wurde. Die Daten aus der hier vorliegenden Arbeit legen also den Schluss nahe, dass die Fähigkeit zur Akkumulation von 4-Ketolutein innerhalb der Gruppe der Grünalgen weit verbreitet ist.

#### **4.1.2. Welche Faktoren kontrollieren das Mengenverhältnis der Ketocarotinoide 4-Ketolutein und Astaxanthin in Grünalgen?**

##### **4.1.2.1. Regulation des Biosyntheseweges durch die Lycopinzyklasen**

Eine Möglichkeit der Regulation des Biosyntheseweges zu Gunsten des vom  $\beta$ -Carotin abgeleiteten Astaxanthins könnte auf der Ebene der Lycopinzyklasen erfolgen. Sollte das Verhältnis von  $\alpha$ -Carotinoiden zu  $\beta$ -Carotinoiden vollständig auf die Seite der von  $\beta$ -Carotin abgeleiteten Carotinoide verschoben werden, so müsste die Enzymaktivität der Lycopin- $\epsilon$ -Zyklase verringert werden, einhergehend mit der Erhöhung der Lycopin- $\beta$ -Zyklase-Aktivität (Abb. 75).

In Übereinstimmung mit dieser Überlegung beobachteten Cordero et al. (2010) für die LCYB aus *M. zoofingiensis* eine Erhöhung des mRNA-Levels bei Stickstoffmangel und damit eine Verschiebung des Biosyntheseweges zugunsten von  $\beta$ -Carotin. Bei Starklicht wurde jedoch keine Erhöhung des LCYB-mRNA-Spiegels gemessen. Dafür erhöhte sich bei Starklicht die Menge an PDS, CHYB und BKT (Huang et al., 2008; Li et al., 2009), das heißt, die Astaxanthin-Biosynthese wurde unter hohen Lichtintensitäten induziert. In der Kombination von Stickstoffmangel und hohen Lichtintensitäten wurde mehr als eine Verdopplung der Astaxanthinmenge gemessen, einhergehend mit einem niedrigeren Luteinspiegel (Cordero et al., 2010).

In *H. pluvialis* wurde von einer Erhöhung des mRNA-Spiegels der LCYB und CHYB sowie der BKT sowohl bei Starklicht als auch bei Nahrungsverknappung berichtet (Steinbrenner und Linden, 2003; Vidhyavathi et al. 2008). Steinbrenner und Linden (2003) gehen dabei von einer Regulation der Genexpression durch den Redoxstatus des photosynthetischen Elektronentransports aus.

In *C. reinhardtii* wurde kürzlich von Sun et al. (2010) die transkriptionelle Kontrolle der Gene CHYB und LCYB belegt. Eine lichtinduzierte Regulation der Transkriptmenge konnte für die beiden Gene nachgewiesen werden.

Zur Aktivität der LCYB und der LCYE bei Starklicht und Nährstoffmangel in den Dauerstadien der Grünalgen gibt es noch keine Untersuchung. Die Untersuchungen zu den drei genannten Algen belegen, dass bei ungünstigen Umweltbedingungen die Transkriptmenge von LCYB hochreguliert wird. Das unterstützt die These, dass bei Ausbildung und Reifung der Dauerstadien die Biosynthese der neu synthetisierten Carotinoide vor allem in die Richtung der vom  $\beta$ -Carotin abgeleiteten Moleküle kanalisiert wird.

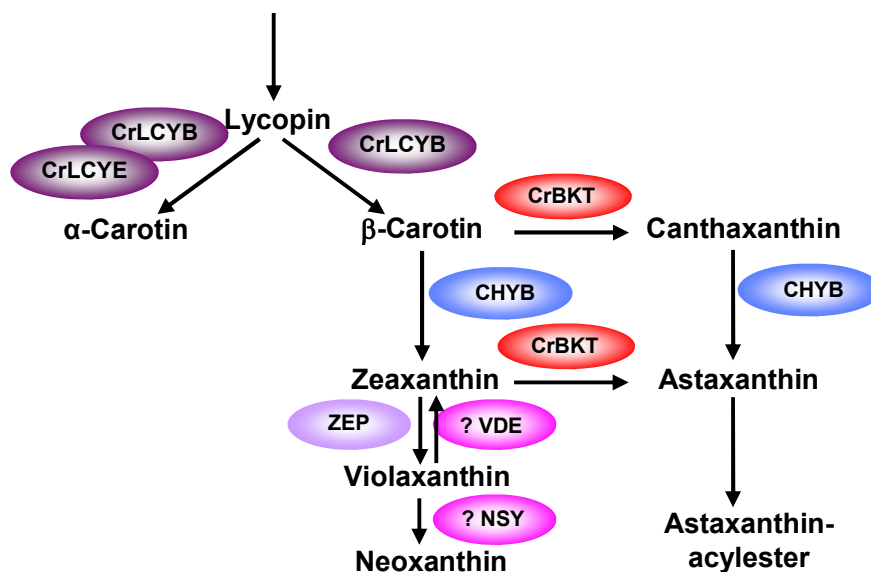
#### **4.1.2.2. Neusynthese vs. Recycling von Carotinoiden als Substrate für die Ketocarotinoidbiosynthese**

Das Verhältnis der von  $\alpha$ -Carotin und  $\beta$ -Carotin abgeleiteten Pigmente könnte also im Biosyntheseweg auf der Stufe der Zyklasten kontrolliert werden, da deren Produkte letztendlich zu den Ketocarotinoiden weiterverarbeitet werden. Bisher gibt es noch keine vergleichenden Studien zum Schutzpotential von Astaxanthin und 4-Ketolutein. Es ist jedoch davon auszugehen, dass auch 4-Ketolutein einen effektiven Schutzmechanismus gegenüber verschiedenen Formen von Stress bietet, da die beiden Pigmente sehr ähnlich sind. Auch der relativ hohe Anteil von 4-Ketolutein in den hier untersuchten Algen spricht für eine dem Astaxanthin vergleichbare Funktion bzw. Schutzeffektivität.

*H. pluvialis* betreibt eine starke Neusynthese von Carotinoiden bei der Ausbildung von Dauerstadien (Lichtenthaler, 1999; Grünewald et al., 2000; Grünewald und Hagen, 2001a). Die Ketocarotinoide stammen vor allem aus der Neusynthese von Carotinoiden als multifunktionale Antwort auf Stress (Lemoine und Schoefs, 2010). Die anderen Algen betreiben möglicherweise eine geringere Neusynthese an Carotinoiden bei der Ausbildung und Reifung der Dauerstadien als *H. pluvialis*, da *H. pluvialis* im reifen Dauerstadium den höchsten bisher bekannten Ketocarotinoidgehalt in Grünalgen pro Trockengewicht aufweist, nämlich bis zu 2-3% (w/w) (Lemoine und Schoefs, 2010), und den höchsten Anteil an vom  $\beta$ -Carotin abgeleiteten Carotinoiden. Neben der Neusynthese von Carotinoiden kommen als Quelle für die Substrate bei der Ketocarotinoidbiosynthese die im Chloroplasten vorhandenen Photosynthesepigmente in Betracht, die im Zuge der starken Größenreduktion des Chloroplasten nicht mehr benötigt werden. Das vermutet Werner (2011) für *C. reinhardtii*, diese Annahme scheint aber für alle Grünalgen plausibel. Die vegetativen Zellen aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Arten enthalten das typische

Pigmentmuster der Grünalgen mit den dominierenden Pigmenten Chlorophyll a, Chlorophyll b, Lutein, Loroaxanthin, Violaxanthin, Neoxanthin und  $\beta$ -Carotin. Die Pigmente Lutein und  $\beta$ -Carotin könnten z. B. durch eine Ketolierung direkt zu 4-Ketolutein bzw. Canthaxanthin umgesetzt werden.

Die zu den pflanzlichen Enzymen VDE und NSY orthologen Enzyme sind in Grünalgen noch nicht charakterisiert. Jedoch ist die Anwesenheit eines Xanthophyllzyklusses bzw. Violaxanthinzyklusses seit vielen Jahren unstrittig (Stransky und Hager, 1979). Nicht nur in vegetativen Zellen, sondern auch in den Dauerstadien aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Algen konnte sowohl Violaxanthin als auch Neoxanthin nachgewiesen werden. In der Ausbildung und Reifung der Aplanosporen und Zygoten kam es allerdings zu einem Abbau des Violaxanthins. Werner (2011) vermutet einen Zusammenhang zwischen dem Abbau von Violaxanthin und der Zunahme von Astaxanthin in *C. reinhardtii*, da die Menge an neu synthetisiertem Astaxanthin nicht größer war als die Menge an abgebautem Violaxanthin. Sie schlussfolgert daraus, dass Violaxanthin zu Zeaxanthin deepoxidiert wird und als Substrat für die Astaxanthinsynthese diente. Schoefs et al. (2001) beschrieben für *H. pluvialis* eine Erhöhung der Zeaxanthinmenge bei der Ausbildung der Aplanosporen. Die Autoren schrieben das dem Xanthophyllzyklus in *H. pluvialis* zu, gingen aber nicht davon aus, dass das Zeaxanthin zur Synthese von Astaxanthin genutzt wird, da ihre Hemmstoffversuche dafür sprachen, dass der Biosyntheseweg zu Astaxanthin über Echinenon verläuft. In *M. zofingiensis* wird dagegen von einer Synthese von Astaxanthin über Zeaxanthin ausgegangen (Huang et al., 2006b; Li et al., 2008b). Hier könnte also das Zeaxanthin aus dem Violaxanthinzyklus genutzt werden.



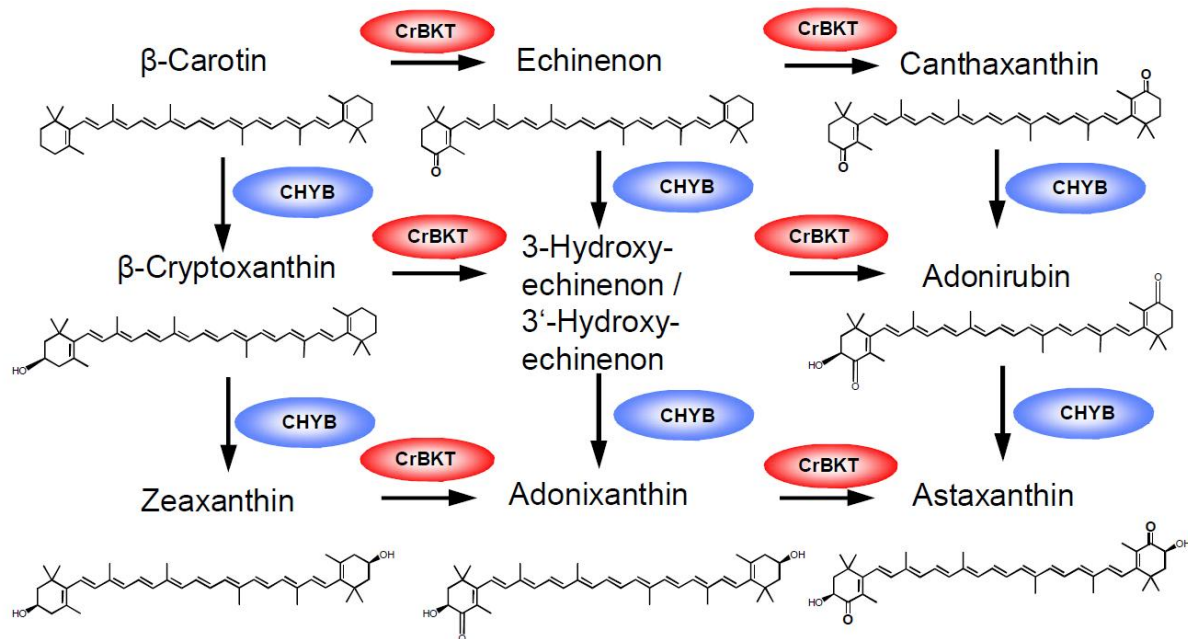
**Abb. 75** Ausschnitt aus der Carotinoidbiosynthese in Grünalgen mit den beteiligten Enzymen.

### 4.1.2.3. Die Spezifität der Ketolasen und der Hydroxylasen

Wie bereits erwähnt kann der Biosyntheseweg zu Astaxanthin ausgehend von  $\beta$ -Carotin theoretisch über Echinenon oder über Zeaxanthin verlaufen (Abb. 75). Akzeptiert die BKT nur das  $\beta$ -Carotin als Substrat, nicht aber Canthaxanthin, muss der Biosyntheseweg zum Astaxanthin über das Zwischenprodukt Zeaxanthin verlaufen.

Die Charakterisierungen zur BKT und CHYB aus *C. reinhardtii* in Kapitel 3.3.2 und 3.3.3.1 zeigten, dass die beiden Enzyme keine sehr hohe Spezifität aufweisen und der Biosyntheseweg von  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin höchstwahrscheinlich nicht durch die Substratspezifität vorgegeben wird. Damit kann also zuerst die Hydroxylierung an der Position 3 des  $\beta$ -Ionringes stattfinden und danach die Ketolierung an der Position 4 oder die umgekehrte Reihenfolge (Abb. 76). Auch eine alternierende Reaktionsfolge wäre denkbar, da pro Molekül zwei Ionringe vorhanden sind.

Andererseits setzte die BKT in den carotinogenen Bakterien  $\beta$ -Carotin schneller zu Canthaxanthin um als Zeaxanthin zu Astaxanthin (Kapitel 3.3.2.3). Die CHYB wiederum setzte Canthaxanthin schneller zu Astaxanthin um als  $\beta$ -Carotin zu Zeaxanthin (Kapitel 3.3.3.1). Demnach verlief in *E. coli* die Umsetzung von  $\beta$ -Carotin über Canthaxanthin zu Astaxanthin schneller als die Umsetzung von  $\beta$ -Carotin über Zeaxanthin zu Astaxanthin. Sofern die in *E. coli* beobachteten Ergebnisse auf die Algen übertragbar sind, sollte also der Syntheseweg von Astaxanthin in *C. reinhardtii*, wie schon für *H. pluvialis* postuliert (Fraser et al., 1998), bevorzugt über Canthaxanthin verlaufen. Dagegen vermuten Huang et al. (2006b) auf Grund einer hohen Akkumulation von Canthaxanthin in *M. zoofingensis*, dass die Hydroxylase in dieser Alge kein Canthaxanthin als Substrat akzeptiert und damit der Biosyntheseweg von Astaxanthin über Zeaxanthin verlaufen muss.



**Abb. 76** Potentielle Biosynthesewege zur Astaxanthinsynthese in *C. reinhardtii* und die daran beteiligten Enzyme BKT und CHYB.

Lutein ist eher mit Zeaxanthin als mit Canthaxanthin vergleichbar. Würde die BKT in den hier untersuchten Grünalgen Lutein als Substrat nicht akzeptieren, wäre von der Existenz einer weiteren bisher nicht identifizierten Ketolase für die Bildung von 4-Ketolutein auszugehen. Wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, kann die BKT aus *C. reinhardtii* auch Lutein zu 4-Ketolutein umsetzen (Kapitel 3.3.2.5). Ausgehend von dieser Beobachtung ist es wahrscheinlich, dass die BKT aus den anderen untersuchten Algen ebenso Lutein umzusetzen vermag.

Eine Ursache dafür, dass *H. pluvialis* nur sehr geringe Mengen an 4-Ketolutein akkumuliert, könnte sein, dass die BKT-Enzyme aus *H. pluvialis* spezifischer sind als die der anderen Algen und Lutein nicht als Substrat akzeptieren. Dazu gibt es jedoch noch keine experimentellen Belege.

Die Neusynthese von Carotinoiden im Verhältnis zum Umbau der vorhandenen Pigmente, sowie die Substratspezifität der BKT und der Hydroxylasen nehmen also Einfluss auf die Stöchiometrie der Ketocarotinoide. Allerdings könnten noch weitere Faktoren eine Rolle spielen, nämlich die Verfügbarkeit der Substrate für die Enzyme BKT und CHYB und der Ort der Akkumulation der Ketocarotinoide.

Ketocarotinoide sind hydrophobe Moleküle. Sind sie mit Fettsäuren verestert, so werden sie durch die langen Kohlenwasserstoffketten noch unpolarer. Carotinoide sind an Proteine gebunden oder kommen frei in Membranen vor (Britton, 1998). Die Kapazität der

Einlagerung in Membranen ist aber begrenzt. Zur Lagerung der Ketocarotinoide gibt es in den Dauerstadien von Grünalgen einen speziellen Ort, die Lipidtröpfchen im Cytoplasma der Zelle (Grünwald et al., 2001b). Sie bestehen vor allem aus Triacylglycerolen, TAGs (Grünwald et al., 2001b; Hu et al., 2008; Werner, 2011). Der Aufbau der Lipidtröpfchen als Ort der Einlagerung der Ketocarotinoidacylcylester geht der Ketocarotinoidbiosynthese voraus (Schoefs et al., 2001; Zhekisheva et al., 2005; Werner, 2011).

Der Ort der Carotinoidbiosynthese ist der Chloroplast. Da die Ketolierung der Carotinoide aber im Cytosol erfolgt (Grünwald et al., 2001b), muss es einen Transportmechanismus für die Carotinoide aus dem Chloroplasten geben. Der Transportprozess ist unbekannt. Grünwald und Hagen (2001a) gehen davon aus, dass es sich bei dem Export um einen nichtvesikulären Transport mit Carotinoidbindemolekülen handelt. Das schließen sie aus Licht- und Elektronenmikroskopanalysen bei der sie keine Vesikelabschnürung während der Akkumulation von Sekundäracarotinoiden in *H. pluvialis* beobachten konnten (Grünwald und Hagen, 2000). Jedoch kann ein vesikulärer Transport nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Für die BKT aus *H. pluvialis* wurde gezeigt, dass das Enzym nicht im Plastiden, sondern nur im Cytosol aktiv ist (Grünwald et al., 2001b). Die bisherigen Daten sprechen dafür, dass der Ort der Ketolierungsreaktion die Hemimembran der Lipidtröpfchen ist (Grünwald et al., 2001b). Geht man davon aus, dass der Biosyntheseweg von Astaxanthin über Canthaxanthin verläuft, wäre damit auch eine cytosolische Hydroxylaseaktivität notwendig. Für *H. pluvialis* lassen Inhibitorexperimente darauf schließen, dass Pigmente auf der Stufe des  $\beta$ -Carotins aus dem Plastiden exportiert werden (Grünwald und Hagen, 2001a).

Für *M. zofingiensis* und *C. reinhardtii* wird der Weg über Zeaxanthin angenommen (Huang et al., 2006b; Li et al., 2008b; Werner, 2011). Wenn Carotinoide auf der Stufe des Zeaxanthins aus dem Chloroplasten transportiert würden, wäre eine cytosolische Hydroxylase nicht notwendig. Unter Starklichtbedingungen wird in den Dauerstadien Violaxanthin zu Zeaxanthin deepoxidiert (Schoefs et al., 2001; Werner, 2011). Werner (2011) geht davon aus, dass das über den Violaxanthinzyklus gebildete Zeaxanthin zur Astaxanthinsynthese genutzt wird. Damit wäre keine cytosolische Aktivität der Hydroxylase in *C. reinhardtii* notwendig. Ein vergleichbares Experiment für die CHYB, wie es Grünwald et al. (2001) für die BKT durchgeführt hat, steht aber bisher aus. Daher kann man nicht ausschließen, dass in *Chlamydomonas*-Zygoten Canthaxanthin von der CHYB umgesetzt wird.

Die Akkumulation von 4-Ketolutein scheint in den Dauerstadien von Grünalgen weit verbreitet. *H. pluvialis* akkumuliert aber nur geringe Mengen des Carotinoids, obwohl seine Vorstufe Lutein als Photosynthesepigment im Chloroplasten in großen Mengen vorliegt. Geht man davon aus, dass es nicht an der Substratspezifität der BKTs in *H. pluvialis* liegt, die

Lutein ausschließt, wäre eine Erklärung für die minimale 4-Ketoluteinmenge allein durch den Verdünnungseffekt bei starker Neusynthese von  $\beta$ -Carotin nicht ausreichend. Es wäre aber auch denkbar, dass *H. pluvialis* Lutein nicht aus dem Chloroplasten exportiert und daher das Pigment nicht durch die BKT im Cytoplasma umgesetzt werden kann.

### **4.1.3. Auffälligkeiten in der Zusammensetzung der freien Pigmente, Monoester und Diester**

#### **4.1.3.1. 4-Ketolutein tritt nur als freies Pigment oder als Monoacyl ester auf**

In den Algen lag der größte Anteil des 4-Ketoluteins nicht in freier Form, sondern in acylierter Form vor, wie es für Astaxanthin und die Astaxanthinacyl ester z. B. in *H. pluvialis* bekannt ist. Die Verseifungsdaten der Ketocarotinoidacyl ester-Fractionen (Kapitel 3.1.6) in der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass 4-Ketolutein ausschließlich als Monoacyl ester auftrat. Daraus lässt sich zum einen schließen, dass der dem  $\beta$ -Ionring gegenüberliegende  $\epsilon$ -Iononring keinen Ausschluss des Substrats durch die bisher unbekannt Acyltransferase/ Acyltransferasen hervorruft. Andererseits kann diese Acyltransferase die Hydroxylgruppe am  $\epsilon$ -Iononring des 4-Ketoluteins höchstwahrscheinlich aus sterischen Gründen nicht acylieren. Bisher liegen allerdings keine Daten zu dem für die Acylierung der Ketocarotinoide verantwortlichen Enzym bzw. den beteiligten Enzymen vor (Lohr, 2009).

#### **4.1.3.2. *F. tuberosa* akkumuliert große Mengen an Echinenon**

Ein weiterer auffälliger Befund war die Beobachtung, dass *F. tuberosa* große Mengen an freiem Echinenon akkumulierte. Das Phänomen wurde in mehreren zeitlich unabhängigen Tests und mit erneut bestellten Kulturen, so wie in einer Zeitreihe der Aplanosporenreifung wiederholt bestätigt (Daten hier nicht gezeigt). Dabei stellt sich die Frage, warum das Pigment nicht weiter zu Canthaxanthin ketoliert wird.

Die Ketocarotinoide Echinenon und Canthaxanthin kommen nicht in acylierter Form vor. Das bedingt ihre Molekülgestalt, da den Pigmenten die für die Esterreaktion essentielle Hydroxygruppe fehlt. Lutein und Zeaxanthin tragen Hydroxylgruppen. Obwohl Lutein und Zeaxanthin in vielen Blüten und Früchten von höheren Pflanzen in veresterter Form mit Fettsäuren auftreten, wurden in den Grünalgendauerstadien keine Fettsäureester dieser beiden Pigmente nachgewiesen. Es wurden ausschließlich Acylester von Adonirubin, 4-Ketolutein und Astaxanthin beobachtet. Eine mögliche Ursache wäre, dass die Pigmente Zeaxanthin und Lutein nicht für das die Veresterung katalysierende Enzym zugänglich wären, z. B. durch eine räumliche Trennung in der Zelle.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass am  $\beta$ -Iononring sowohl die Hydroxygruppe als auch die Ketogruppe vorhanden sein muss, damit die Veresterungsreaktion stattfindet, die Pigmente also über die Substratspezifität des katalysierenden Enzyms/ der Enzyme in den hier



vorliegenden Grünalgendauerstadien ausgeschlossen werden. Beide Möglichkeiten schließen sich einander nicht aus, da das acylierende Enzym/ die Enzyme sehr wahrscheinlich cytosolisch lokalisiert sind, denn dort werden aller Voraussicht nach die Ketocarotinoidsubstrate gebildet.

#### **4.1.4. Die Identität der Fettsäuren in den Ketocarotinoidacylestern**

Einige Pigmente traten als Acylierungsprodukt mit verschiedenen Fettsäureresten auf. Das konnte aus der großen Zahl an Ketoacylsterpeaks gegenüber der geringen Zahl an Pigmenten nach der Verseifung geschlossen werden. Die Verseifungsreaktion setzte die Pigmentspezies frei. Sie eluierten früher von der C<sub>18</sub>-Säule in der HPLC und waren also deutlich polarer als zuvor. Die Fettsäuren in *H. pluvialis* haben überwiegend Kettenlängen von C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> und sind sowohl als ungesättigte, als auch als gesättigte Moleküle vertreten (Renstom and Liaaen-Jensen, 1981; Miao et al., 2006; Lemoine et al., 2008). Der Schluss liegt nahe, dass es sich bei *C. reinhardtii* um die gleichen Fettsäurespezies handeln könnte. Eine genaue Bestimmung der Fettsäurereste aus den Ketocarotinoidacylestern wurde in der vorliegenden Arbeit angestrebt und vorbereitet. Ein technischer Defekt in der APCI-Einheit der LCMS-Anlage eines Kooperationspartners verhinderte allerdings die Analyse der Proben, sodass ein Abschluss der Fettsäureanalyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich war.

Lohr (2009) vermutet als Funktion der Acylierung eine Rolle in der Abscheidung der Carotinoide in die Lipidtröpfchen und einen Mechanismus zur Vermeidung der Kristallisation der Pigmente als Voraussetzung für die Lagerung großer Pigmentmengen. Zudem sprechen Untersuchungen von Ceron et al. (2007) dafür, dass die acylierten Pigmentspezies aufgrund eines höheren antioxidative Potentials einen höheren Schutz gegenüber ROS bieten als die freien Ketocarotinoide.

### **4.2. Erweiterung des Portfolios an carotinogenen *E. coli*-Stämmen als Voraussetzung für Screenings und Charakterisierung von Carotinoidbiosyntheseenzymen**

Viele Fragen in der Biosynthese von Carotinoiden sind noch ungeklärt. In der Forschung besteht ein Bedarf an neuen Carotinoiden als Referenzpigmenten und Substraten, die kommerziell nicht erhältlich sind. Eine chemische Vollsynthese ist schwierig und besonders asymmetrische Carotinoide sind aufwendiger zu synthetisieren. 1990 entwickelten Misawa et al. (1990) Plasmide mit Genen aus dem Bakterium *Erwinia uredovora*, die *E. coli* befähigen Carotinoide zu produzieren. Die Verwendung dieser carotinogenen Bakterien hat in der Carotinoidbiosyntheseforschung einen festen Platz eingenommen und wird für Screenings und Charakterisierungen von neuen Carotinoidbiosyntheseenzymen genutzt. Da es im Vorfeld meiner Arbeit trotz mehrerer Anläufe und Variationen der Versuchsbedingungen nicht gelungen war, für die BKT aus *C. reinhardtii* in einem *in-vitro*-Versuchssystem analog zu den Versuchen von Fraser et al. (1997, 1998) Aktivität nachzuweisen, war es notwendig Bakterienstämme herzustellen, die neue Substrate produzieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, auf der Basis des pACCAR25 $\Delta$ crtX-Plasmids (Misawa et al., 1995) eine Reihe von neuen carotinogenen Plasmiden herzustellen und damit das zur Verfügung stehende Substratportfolio von Carotinoid produzierenden Bakterienstämmen deutlich zu erweitern. Besonders hervorzuheben sind dabei die  $\alpha$ -Carotin und Lutein produzierenden Stämme. Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert.

#### **4.2.1. Herstellung neuer *E. coli*-Bakterienstämme mit der Fähigkeit zur Produktion von Canthaxanthin, $\gamma$ -Carotin und Rubixanthin**

In der Literatur wurde bereits ein Canthaxanthin produzierender Bakterienstamm beschrieben (pAC-Cantha von Nishida et al. 2005). Dieser enthält ein bakterielles crtO-Gen. Der in der vorliegenden Arbeit hergestellte Stamm enthielt das BKT-Gen aus *C. reinhardtii*. Der Anteil des durch den Stamm produzierten Canthaxanthins lag bei über 95% des insgesamt detektierten Pigmentgehalts. Daneben wurden die Zwischenprodukte Echinenon und  $\beta$ -Carotin detektiert.

Im hier hergestellten  $\gamma$ -Carotin produzierenden Bakterienstamm, der anstelle des bakteriellen Zyklasegens *crtY* das LCYB-Gen aus *C. reinhardtii* exprimierte, machte  $\gamma$ -Carotin neben  $\beta$ -Carotin, dem Hauptprodukt der LCYB, und dem Substrat Lycopin nur einen geringen Anteil aus. Dennoch konnten auch mithilfe des vergleichsweise geringen  $\gamma$ -Carotin-Gehaltes eine

Reihe funktioneller Charakterisierungen von Enzymen durchgeführt werden. (Daten hier nicht gezeigt).

Der Rubixanthin produzierende Bakterienstamm enthielt neben dem LCYB-Gen aus *C. reinhardtii* noch die bakterielle Hydroxylase crtZ aus *E. uredoovora*. In den Bakterien akkumulierte neben dem Hauptprodukt Rubixanthin das Pigment Zeaxanthin.

#### **4.2.2. Charakterisierung eines Zyklasefusionsproteins aus der ursprünglichen Grünalge *Ostreococcus lucimarinus***

#### **4.2.3. Entwicklung eines $\alpha$ -Carotin produzierenden *E. coli*-Stammes**

Ab der Stufe des Lycopins spaltet sich der Biosyntheseweg der Carotinoide in Landpflanzen und Grünalgen in zwei Äste auf. An der Reaktion in höheren Pflanzen, wie z. B. *A. thaliana* sind zwei Enzyme beteiligt, die Lycopin- $\epsilon$ -Zyklase (LCYE) und die Lycopin- $\beta$ -Zyklase (LCYB) (Cunningham et al., 1996). Auch in *C. reinhardtii* wurden orthologe Enzyme gefunden (Lohr et al., 2005). Der Test der LCYB aus *C. reinhardtii* in lycopinogenen *E. coli* in der hier vorliegenden Arbeit zeigte, dass die LCYB die beiden Enden des Lycopinmoleküls zu  $\beta$ -Iononringen zu zyklisieren vermag, wodurch über das Zwischenprodukt  $\gamma$ -Carotin mit einem Iononring  $\beta$ -Carotin entstand (siehe 4.2.2). Die LCYE katalysierte ohne die Anwesenheit der LCYB im Bakterienversuch nur die Bildung von  $\delta$ -Carotin sowie einer geringen Menge an  $\epsilon$ -Carotin (Plew, 2009). Waren beide Enzyme gleichzeitig anwesend wurde  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Carotin gebildet. War eine höhere Menge an LCYE als an LCYB anwesend, wie es bei der Induktion der LCYE über Nacht der Fall war, so wurde nur  $\alpha$ -Carotin synthetisiert. Somit schien eine Kombination der beiden Zyklasen aus *C. reinhardtii* für die Synthese von  $\alpha$ -Carotin in *E. coli* grundsätzlich geeignet.

Allerdings wurde neben den Lycopinzyklasen aus *C. reinhardtii* auch eine Lycopinzyklase aus der ursprünglichen Grünalge *O. lucimarinus* auf ihre Eignung zur Herstellung eines  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes untersucht. Die Zyklase nahm eine Sonderstellung unter den Zyklasen ein, da sie die Lycopin- $\epsilon$ - und Lycopin- $\beta$ -Zyklase in einem Fusionsenzym vereint. Das Fusionsprotein katalysierte in der heterologen Expression in lycopinogenen *E. coli* die Zyklisierung des Lycopins zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin im Verhältnis 1,15:1 und erwies sich somit als am besten geeignet für die Herstellung eines  $\alpha$ -Carotin bildenden Bakterienstammes, da für die Expression nur ein Promotor erforderlich war. Außerdem ist davon auszugehen, dass dieses Fusionsenzym die beiden Produkte  $\alpha$ -Carotin und  $\beta$ -Carotin in konstanter Stöchiometrie bildet, was mit zwei unabhängig exprimierten Zyklase-Enzymen,

wie sie bei den meisten grünen Pflanzen in der Carotinoidbiosynthese vorkommen, schwerer zu bewerkstelligen ist.

#### 4.2.4. Entwicklung eines Lutein produzierenden *E. coli*-Stammes

Die crtZ ist als  $\beta$ -Iononring-Hydroxylase seit Misawa et al. (1995) bekannt. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente zeigen, dass die bakterielle Hydroxylase crtZ aus *Erwinia uredovora* in der Lage ist, aus  $\alpha$ -Carotin Lutein herzustellen. Die native Sequenz der crtZ setzte  $\alpha$ -Carotin zu Zeinoxanthin, Lutein und einem weiteren Pigment um, das vorläufig als Luteinderivat identifiziert wurde, da es das gleiche Spektrum wie Lutein aufwies (Abb. 49, Abb. 50). Möglicherweise handelt es sich um ein Stereoisomer des Luteins, das die Hydroxygruppe in der entgegengesetzten Konformation trägt. Die veränderte Symmetrie des nicht planaren Moleküls würde dabei den Unterschied in der Retentionszeit erklären. Eine massenspektrometrische Untersuchung des Pigments konnte bisher nicht durchgeführt werden, da eine LCMS mit APCI-Einheit nicht zur Verfügung stand und das Pigment für eine Aufreinigung und eine klassische MS-Untersuchung mit ESI nicht in ausreichender Konzentration aufgereinigt werden konnte. Bedeutender als die Identität des nur vorläufig identifizierbaren Produkts war die Tatsache, dass die crtZ aus *E. uredovora* in der Lage war  $\alpha$ -Carotin zu Lutein zu hydroxylieren (Abb. 50). Damit war die Grundlage gegeben, um einen weiteren Bakterienstamm herzustellen, der Lutein produziert. Dieser Stamm war erforderlich, um die Substratspezifität der BKT zu untersuchen und bietet darüber hinaus eine wichtige Grundlage für weitere Forschungsarbeiten an Lutein modifizierenden Enzymen aus anderen Organismen.

Einer der Vorversuche zur Herstellung des Lutein produzierenden Bakterienstammes überraschte zunächst. Die crtZ wurde isoliert, in den pBAD-Expressionsvektor kloniert und im  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstamm getestet. In diesem Experiment vermochte das Enzym nur Zeinoxanthin zu synthetisieren, aber kein Lutein. Der wesentliche Unterschied zu den vorausgegangenen Versuchen bestand darin, dass der verwendete pBAD-Expressionsvektor dem crtZ-Protein N-terminal eine 14 Aminosäure lange vektorspezifische Sequenz anhängt. Der Kontrollversuch ohne diese Aminosäuresequenz bestätigte diese Vermutung. Die Substratspezifität der crtZ kann also mit kurzen Modifikationen im N-terminalen Bereich entscheidend verändert werden.

Der Lutein produzierende Bakterienstamm wurde letztendlich auf Basis des  $\alpha$ -Carotin produzierenden Bakterienstammes erstellt, indem in das Plasmid pALPHA noch das crtZ-Gen eingebracht wurde. Das Produktspektrum des resultierenden Bakterienstammes war

relativ komplex (Abb. 54) und enthielt die Pigmente Lycopin,  $\delta$ -Carotin, Zeinoxanthin, Zeaxanthin, Lutein und das potentielle Luteinderivat.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen CYP97-Gene bergen ein hohes biotechnologisches Anwendungspotential für die Erweiterung der Pigmentportfolios der carotinogenen *E. coli*-Stämme. Es ist zu erwarten, dass sich durch die Einbringung des Gens CYP97C3 in den Vektor pLUTEIN der Anteil an Nebenprodukten in der Pigmentzusammensetzung stark reduzieren würde und eine höhere Ausbeute an Lutein erreicht werden könnte.

### 4.3. Der Biosyntheseweg der Ketocarotinoide in der Grünalge *C. reinhardtii*

*C. reinhardtii* ist seit Jahrzehnten ein Modellorganismus in der Pigmentforschung. Dass der Organismus wie viele andere Grünalgen Ketocarotinoide synthetisieren kann, ist erst seit Kurzem bekannt (Werner, 2011).

Lohr (2005) verglich im Zuge von Arbeiten am *C. reinhardtii*-Genomprojekt EST-Sequenzen und leitete anhand von Sequenzhomologien zu bereits bekannten Enzymen aus anderen Organismen deren Funktion ab. Aus den Ergebnissen erstellte er einen potentiellen Biosyntheseweg der Carotinoidbiosynthese aus *C. reinhardtii*. Schmidt (2007) konnte die BKT aus *C. reinhardtii* amplifizieren und zwischenklonieren. Bauch (2007) führte erste Charakterisierungen der BKT und der CHYB aus *C. reinhardtii* in *E. coli* durch. Doch es fehlte an einer Reihe von Substraten in den Bakterienzellen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Substratspezifität der späten Carotinoidbiosyntheseenzyme aus *C. reinhardtii* inklusive des für die Ketolierung in der Ketocarotinoidbiosynthese entscheidenden Enzyms BKT nun mithilfe der neu etablierten carotinogenen Bakterienstämme detailliert charakterisiert werden. Die Ergebnisse werden nachfolgend diskutiert.

#### 4.3.1. Funktion der $\beta$ -Carotin-Ketolase (BKT) aus *C. reinhardtii*

Charakterisierungen der BKT aus *H. pluvialis* wurden von Fraser et al. (1998), Lotan und Hirschberg (1995), Kajiwara et al. (1995), Breitenbach et al. (1996) sowie Huang et al. (2006) vorgenommen, und Untersuchungen zur BKT aus *M. zofingiensis* von Huang et al. (2006) und Zhong et al. (2011) durchgeführt. In *H. pluvialis* gibt es drei verschiedene BKT-Gene. Aus *M. zofingiensis* und *S. rubescens* ist nur jeweils ein BKT-Gen bekannt und Gleiches gilt auch für *C. reinhardtii* (Lohr et al., 2005).

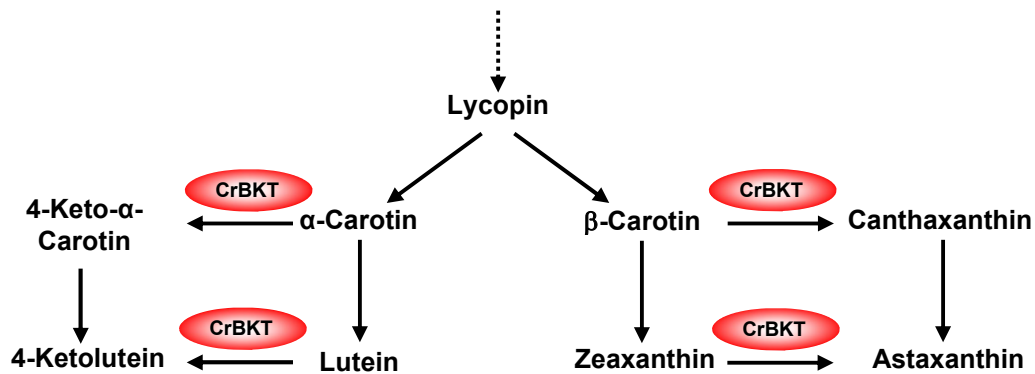
Die vorliegende Arbeit zeigt, dass dieses BKT-Gen für das Schlüsselenzym in der Ketocarotinoidbiosynthese von *C. reinhardtii* kodiert, das für die Ketolierung aller in den Zygosporen detektierten Ketocarotinoidspezies verantwortlich ist. Der Anstieg der Pigmentmenge war bei allen Bakterienkulturen während der Induktion geringer als die Menge des in dieser Zeit neu akkumulierenden ketolierten Endprodukts und korrelierte mit einem Abbau des entsprechenden erwarteten Substrats. Die hypothetischen Biosynthesewege, die in den Ergebnissen vorgestellt wurden, konnten damit bestätigt werden und sind in Abb. 77 zusammengefasst. Nur die Interpretation der Induktion der BKT im Lutein produzierenden Bakterienstamm war etwas schwieriger, da das Spektrum der Pigmente eine komplexere Zusammensetzung aufwies. Insgesamt stieg hier die Pigmentmenge während der Induktion

stärker an als die Menge des hypothetischen ketolierten Endprodukts 4-Ketolutein. Die absolute Menge an Lutein nahm jedoch während der Induktion deutlich ab. Damit muss Lutein in den 45 Minuten durch die BKT zu 4-Ketolutein ketoliert worden sein, da die Wahrscheinlichkeit für einen Turnover des Substrats als gering angesehen werden kann.

Mit der BKT aus *C. reinhardtii* beschäftigen sich noch weitere Arbeitsgruppen. Zhong et al. (2011) testeten parallel zu der hier vorgelegten Arbeit ebenfalls die BKT aus *C. reinhardtii* in carotinogenen *E. coli*. Jedoch erfolgte der Test nur mit den Substraten Zeaxanthin und  $\beta$ -Carotin als grundsätzlicher Nachweis, dass das Enzym Aktivität zeigt, um es anschließend in *A. thaliana* zu exprimieren. Zhong et al. (2011) testeten bei den Versuchen auch nicht das Volllängenzym der BKT, sondern eine um die 120 C-terminalen, bei homologen BKT-Enzymen fehlenden Aminosäuren verkürzte Version.

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Volllängenzym der BKT aus *C. reinhardtii* akzeptierte die Substrate  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin, Rubixanthin,  $\gamma$ -Carotin,  $\alpha$ -Carotin und Lutein. Es konnte den  $\beta$ -Iononring der Carotinoidmoleküle an der Position 4 ketolieren. Die funktionelle Charakterisierung zeigte darüber hinaus, dass durch das Enzym auch Substrate akzeptiert werden, die bereits eine Hydroxylierung an der Position 3 des zu ketolierenden Iononrings aufweisen. Außerdem wurden Substrate in vergleichbaren Umsatzraten akzeptiert, die an der gegenüberliegenden Seite des Moleküls einen  $\beta$ -Iononring, einen  $\epsilon$ -Iononring oder auch keinen Iononring haben, wie die Moleküle Rubixanthin und  $\gamma$ -Carotin. Daraus lässt sich schließen, dass die dem  $\beta$ -Iononring gegenüberliegende Seite des Carotinoidmoleküls nicht mit in die Substraterkennung des Enzyms eingeschlossen ist.

Als Produkte der Enzymreaktion mit der BKT wurden unter anderem die Moleküle Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, und Adonixanthin nachgewiesen. Besonders bedeutend war der Befund, dass durch das Enzym aus *C. reinhardtii* auch 4-Ketolutein synthetisiert werden kann, denn dieses Ergebnis konnte bisher noch keine Arbeitsgruppe erzielen. Die aufgezählten Ketocarotinoide sind genau die Pigmentspezies, die in erheblichen Mengen in den Dauerstadien der Grünalgen akkumulieren. Das 4-Ketolutein ist zudem das Carotinoid mit dem größten Mengenanteil in den Zygosporen von *C. reinhardtii*, wie die vorliegende Arbeit zeigt.



**Abb. 77** Ausschnitt aus der Carotinoidbiosynthese in *C. reinhardtii* mit dem an den entsprechenden Syntheseschritten beteiligten Enzyme der BKT ( $\beta$ -Carotin-Ketolase). Die Funktion wurde durch die Charakterisierung des Enzyms in carotinogenen *E. coli* verifiziert.

#### 4.3.2. Carotinoid-Hydroxylierung in *C. reinhardtii*

In *C. reinhardtii* wurden drei zu den Carotinoidhydroxylaseenzymen aus *A. thaliana* orthologe Enzymkandidaten von Lohr (2009) postuliert. Es handelt sich um eine Häm-freie Eisen-II-Monooxygenase Carotinoid- $\beta$ -Hydroxylase (CHYB) und zwei Häm-haltige Cytochrom P450-Enzyme, die CYP97A5 und die CYP97C3.

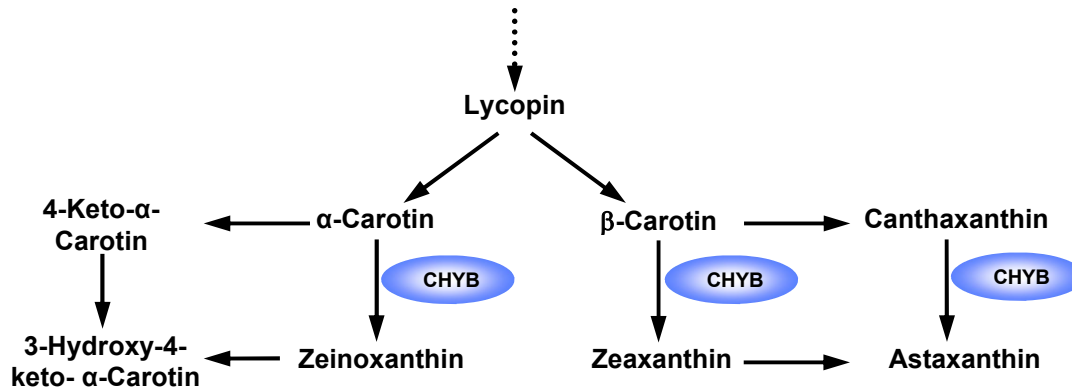
Bei den funktionellen Charakterisierungen der Carotinoidhydroxylasen aus sämtlichen Organismen, die bisher in *E. coli* durchgeführt wurden, konnte das potentielle Substrat  $\alpha$ -Carotin nicht getestet werden, da der notwendige  $\alpha$ -Carotin produzierende Bakterienstamm nicht zur Verfügung stand. Durch die Herstellung eines solchen Stammes in der vorliegenden Arbeit wurden die entsprechenden Untersuchungen nun möglich.

##### 4.3.2.1. Die Häm-freie $\beta$ -Carotin-Hydroxylase (CHYB)

Die funktionelle Charakterisierung der CHYB aus *C. reinhardtii* in *E. coli* zeigte, dass das Enzym die  $\beta$ -Iononringe an der Position 3 zu hydroxylieren vermag (Kapitel 3.3.3.1). Das Enzym akzeptierte die Substrate  $\beta$ -Carotin,  $\gamma$ -Carotin und Canthaxanthin. Die CHYB vermochte auch den  $\beta$ -Iononring des  $\alpha$ -Carotins zu Zeinoxanthin zu hydroxylieren (Abb. 69). Es ist davon auszugehen, dass die CHYB auch in vivo den  $\beta$ -Iononring des  $\alpha$ -Carotins hydroxyliert. Die Hypothese wird von Untersuchungen von *C. reinhardtii*-Mutanten gestützt, bei denen die CYP97A5 defekt ist (siehe Elbers, 2011). Hier akkumulierte trotz der defekten CYP97A5 eine geringe Menge an Zeinoxanthin, was der CHYB zugeschrieben werden kann.



Damit ergibt sich eine Veränderung im bisher postulierten Biosyntheseweg in *C. reinhardtii*. An der Hydroxylierung des  $\alpha$ -Carotins zu Lutein sind demnach drei Hydroxylasen beteiligt (Abb. 75).

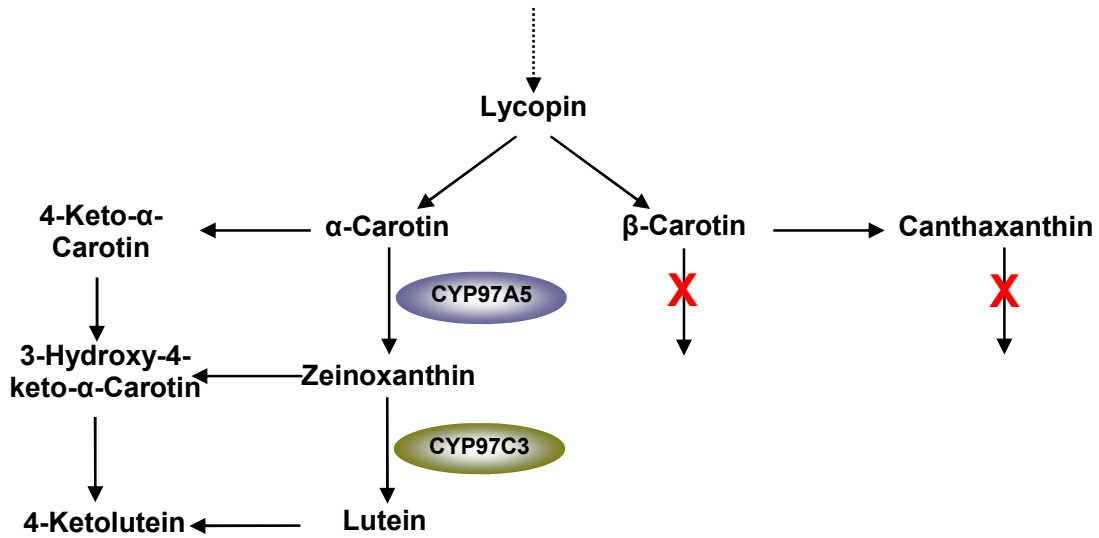


**Abb. 78** Ausschnitt aus der Carotinoidbiosynthese in *C. reinhardtii* mit dem an den entsprechenden Syntheseschritten beteiligten Enzym der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase (CHYB). Die Funktion wurde durch die Charakterisierung des Enzyms in carotinogenen *E. coli* verifiziert.

#### 4.3.2.2. Die Cytochrom P450 Carotinoidhydroxylasen (CYP97A5, CYP97C3)

Die funktionellen Charakterisierungen der Cytochrom-P450-Carotinoidhydroxylasen ergaben, dass die CYP97A5  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin nur in sehr geringen Mengen umsetzen kann und die CYP97C3 mit beiden Substraten keine Aktivität zeigte. Demnach ist die CHYB das einzige Pigment, das auf dem  $\beta$ -Carotin-Zweig des Biosynthesewegs arbeitet und die Pigmente  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin umzusetzen vermag (Abb. 80). Im Bakterienversuch zeigte sich auch, dass die CYP97A5 den  $\beta$ -Iononring des  $\alpha$ -Carotins schneller hydroxyliert, als die CYP97C3 den  $\epsilon$ -Iononring des  $\alpha$ -Carotins. Dies unterstützt die Hypothese, dass zunächst der  $\beta$ -Iononring des  $\alpha$ -Carotins hydroxyliert wird und dann erst der  $\epsilon$ -Iononring (Kapitel 3.3.3.2, Abb. 73).

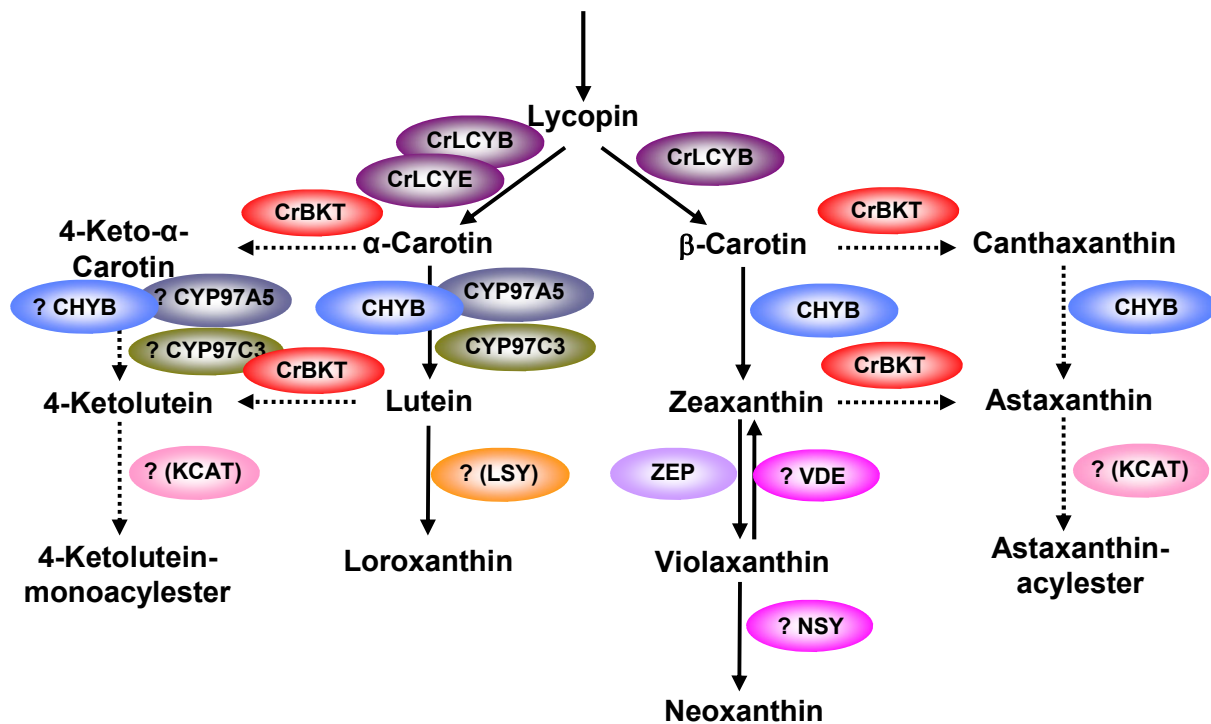
Versuche in *H. pluvialis* mit dem Hemmstoff Ellipticin zur Inhibition von Cytochrom P450-Enzymen ließen Schoefs et al. (2001) schließen, dass eine P450-Hydroxylase an der Synthese von Astaxanthin beteiligt ist. Ein entsprechendes in Frage kommendes Gen wurde jedoch nicht charakterisiert oder benannt. Die in der vorliegenden Arbeit geschilderten Versuche zeigten dagegen, dass die P450-Hydroxylasen CYP97A5 und die CYP97C3 nicht an der Biosynthese von Astaxanthin in *C. reinhardtii* beteiligt sind, aber maßgeblich für die Hydroxylierung von  $\alpha$ -Carotin zu Lutein verantwortlich sind (Abb. 79).



**Abb. 79** Ausschnitt aus der Carotinoidbiosynthese in *C. reinhardtii* mit den an den entsprechenden Syntheseschritten beteiligten Enzymen der CYP97A5 bzw. CYP97C3. Die Funktion wurde durch die Charakterisierung des Enzyms in carotinogenen *E. coli* verifiziert.

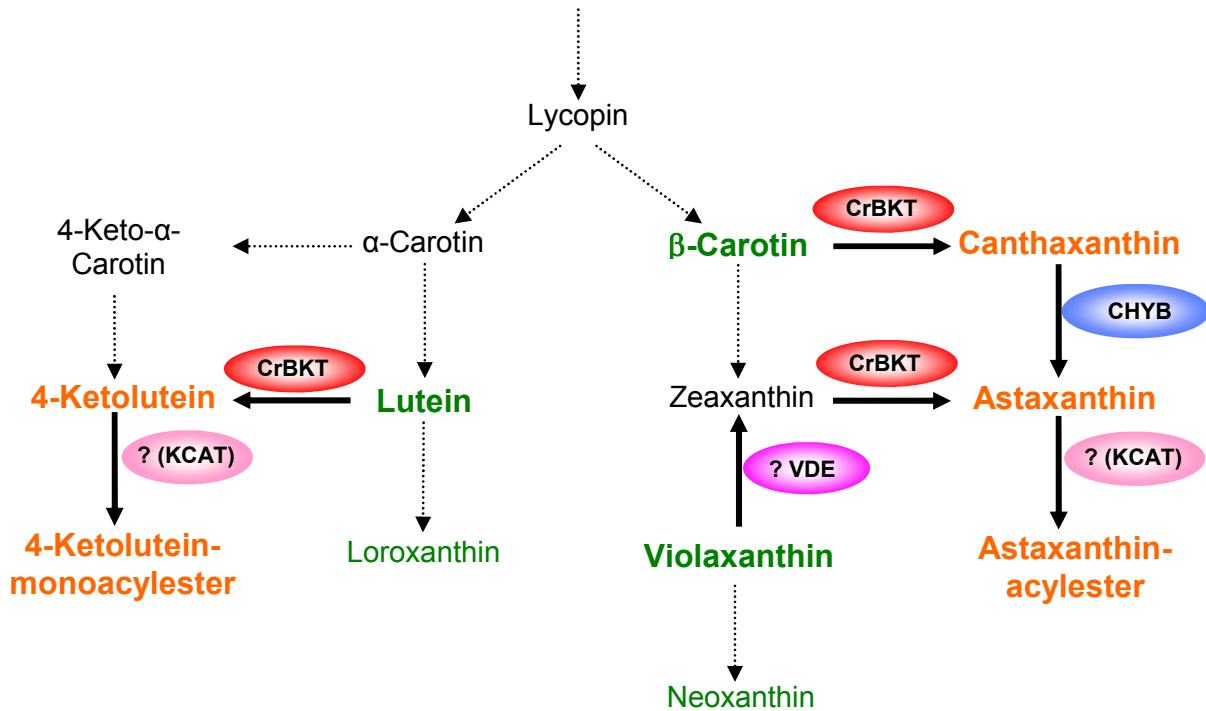
### 4.3.3. Der Weg der Biosynthese von Ketocarotinoiden in *C. reinhardtii*

Aus den Ergebnissen und den diskutierten Daten ergibt sich das in Abb. 80 dargestellte Schema für die Carotinoidbiosynthese in *C. reinhardtii*. Bei dem Schaubild wurde davon ausgegangen, dass die Hydroxylasen auch 4-Keto- $\alpha$ -Carotin hydroxylieren können. Hierzu liegt allerdings noch keine experimentelle Bestätigung vor. Alle anderen Biosynthesewege bis auf die mit Fragezeichen gekennzeichneten Pfade sind durch funktionelle Charakterisierungen in *E. coli* als prinzipiell möglich abgesichert.



**Abb. 80** Ausschnitt aus der Carotinoidbiosynthese in *C. reinhardtii* mit den an den einzelnen Syntheseschritten beteiligten Enzymen. LCYB ( $\beta$ -Carotin-Zyklase), LCYE ( $\epsilon$ -Carotin-Zyklase), BKT ( $\beta$ -Carotin-Ketolase), CHYB ( $\beta$ -Carotin-Hydroxylase), CYP97A5 ( $\beta$ -Carotin-Hydroxylase), CYP97C3 ( $\epsilon$ -Carotin-Hydroxylase), LSY (Loroxanthin-Synthase), KCAT (Ketocarotinoid-Acyltransferase), VDE (Violaxanthin-Deepoxidase), NSY (Neoxanthin-Synthase), (ZEP) Zeaxanthin-Epoxidase. Mit Fragezeichen markierte Enzyme sind bisher noch nicht charakterisiert. Die durchgezogenen Pfeile deuten Reaktionen an, die auch in der Biosynthese der Carotinoide in den vegetativen Zellen ablaufen. Pfeile mit perforierten Linien markieren Reaktionen die ausschließlich in Zygosporen ablaufen.

Für die Ketocarotinoidsynthese in der Zygotenreifung von *C. reinhardtii* ergibt sich aus den Ergebnissen und den diskutierten Daten ein neues Biosyntheschema (Abb. 81). Die Neusynthese von Carotinoiden ist im Stadium der Zygotenreifung wahrscheinlich sehr gering, weshalb überwiegend bereits vorhandene Primärcarotinoide Lutein,  $\beta$ -Carotin und Violaxanthin für die Synthese genutzt werden.



**Abb. 81** Ausschnitt aus der Ketocarotinoidbiosynthese in reifenden Zygoten von *C. reinhardtii* mit den an den einzelnen Syntheseschritten beteiligten Enzymen. BKT ( $\beta$ -Carotin-Ketolase), CHYB ( $\beta$ -Carotin-Hydroxylase), VDE (Violaxanthin-Deepoxidase), KCAT (Ketocarotinoid-Acyltransferase). Mit Fragezeichen markierte Enzyme sind bisher noch nicht charakterisiert. Die durchgezogenen Pfeile deuten aktive Reaktionswege an. Pfeile mit gepunkteten Linien markieren inaktive Reaktionspfade.

#### 4.3.4. Regulation der Zygosporenspezifität der Ketocarotinoidbiosynthese in *C. reinhardtii*

Als Reaktion auf Stickstoffmangel sind in *C. reinhardtii* bisher drei hierarchisch regulierte Genexpressionsprogramme beschrieben worden: ein Programm zur Adaptation an Stickstoffmangel, ein Gametendifferenzierungsprogramm und ein Zygotenbildungsprogramm (Abe et al., 2005a; Abe et al., 2005b; Goodenough et al., 2007).

Eine entscheidende Rolle beim Zygotenbildungsprogramm kommt den autosomalen Genen der Homeoproteine GSP1 und GSM1 zu, deren Expression in der vegetativen Wildtypzelle nur sehr gering ist, während ihre maximale Konzentration bei der Agglutination der Gameten erreicht wird (Goodenough et al., 2007). Das Homeoprotein GSM kommt aus dem Minus-Stamm, GSP aus dem Plus-Stamm. Durch kombinatorische ektopische Expressionsstudien der Gene in haploiden, vegetativen Zellen konnte die Heterodimerisation dieser zwei Genprodukte als Transkriptions-Regulations-Komplex für die Expression von zygotenspezifischen Genen und damit der Zygotenentwicklung nachgewiesen werden. Die Initiierung des Zygotenprogramms wurde so auch ohne vorherige Gametenverschmelzung möglich (Zhao et al., 2001; Lee et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden diese von Zhao et al. (2001) und Lee et al. (2008) beschriebenen Transformanten auf ihre Fähigkeit zur Ketocarotinoidakkumulation getestet (vgl. Ergebnisse, Kapitel 3.2.) Die Transformante T-GSM1\_mt+/mt+ ist eine diploide vegetative Zelllinie von *C. reinhardtii*, die unter Stickstoffmangel ein Zygotenprogramm initiiert, ohne dass eine Paarung notwendig ist. Die Mutante T-GSM1/T-GSP1\_mt+ ist eine haploide Zelllinie, die konstitutiv GSP1 und GSM1 exprimiert und so auch ohne Stickstoffmangel ein Zygotenprogramm ablaufen lässt. Der dritte getestete Stamm ist die Mutante T-GSM1\_mt+, haploide Zellen, die unter Stickstoffmangel Zygosporenprogrammaktivität zeigen. Bei allen drei Mutanten konnten Zhao et al. (2001) und Lee et al. (2008) die zygotenspezifische Zellwandsynthese beobachten und die Expression von zygotenspezifischen Genen nachweisen. Im Konstrukt mit dem diploiden Hintergrund konnte sogar eine anschließende Meiose beobachtet werden (Lee et al., 2008).

Typische Wildtypzygoten von *C. reinhardtii* akkumulieren nach einigen Tagen der Zygotenreifeung Ketocarotinoide (Werner, 2011). In den Untersuchungen von Lee et al. (2008) und Zhao et al. (2001) wurde aber nicht untersucht, ob diese Mutanten Ketocarotinoide synthetisieren können. Wäre das der Fall, so gäben GSM1 und GSP1 auch das Signal zum Anstoßen der Ketocarotinoidsynthese. Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Pigmentuntersuchungen an diesen Transformanten kann das

ausgeschlossen werden (Kapitel 3.2). Offensichtlich gibt es noch mindestens einen weiteren Schalter, der für die Induktion der Ketocarotinoidbiosynthese notwendig ist.

Kubo et al. (2008) konnten durch Mikroarray-Studien 21 neue Gene finden, die während der Gametenpaarung und der Bildung der frühen Zygote von *C. reinhardtii* exprimiert werden. Darunter befanden sich sowohl Gene für Proteine unbekannter Funktion, als auch Gene, deren Produkte vermutlich in Prozessen wie der Zellwandsynthese, intrazellulärem Transport oder Sekretion und vesikulärem Transport in den Zygoten involviert sind (Kubo et al., 2008). Untersucht wurden jedoch nur die Genexpressionsmuster der ersten sieben Stunden nach der Paarung. Erst in einer späteren Phase der Zygotenreifung werden die Plastiden reduziert und die Lipidtröpfchen gebildet. Für diese Phase liegt noch keine Studie vor. Über die Regulation der Carotinoidbiosynthese und die Induktion zur Bildung der Ketocarotinoid akkumulierenden Strukturen ist folglich noch nichts bekannt.

Dementsprechend bieten Versuche zur Untersuchung der Transkriptionsmuster aus Zygoten während der Bildungs-, Reifungs- und anschließenden Keimungsstadien mittels Next-Generation-Sequenzierung-Techniken einen sehr vielversprechenden Ansatz zur Aufklärung der Regulation. Ebenfalls könnten Proteomanalysen von diesen Stadien wichtige neue Erkenntnisse bringen. Beide Methoden können dabei auf die Informationen aus dem vollständig sequenzierten Genom von *C. reinhardtii* zurückgreifen, was die Identifizierung der entsprechenden Gene bzw. Proteine wesentlich erleichtern wird.

## 5. Zusammenfassung

Grünalgen bilden zur Überdauerung schlechter Umweltbedingungen Ruhestadien, die sich durch Ausbildung einer festen Zellwand, die Reduktion des Plastiden und die starke Akkumulation von Speicherfetten und Ketocarotinoiden im Zytosol auszeichnen. Obwohl Ketocarotinoide in Grünalgen seit über vierzig Jahren beforscht werden, gab es hierzu noch wenige molekularbiologische Untersuchungen. Im Vorfeld meiner Promotion wurde durch unsere Arbeitsgruppe entdeckt, dass auch der molekular gut zugängliche Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii* im Zygotenstadium große Mengen an Ketocarotinoiden bildet. Neben dem zu erwartenden Ketocarotinoid Astaxanthin fanden wir große Mengen des bisher nur in einer Grünalge beschriebenen 4-Ketoluteins. Vorversuche ließen die Vermutung aufkommen, dass dieses Pigment bei der Untersuchung der Pigmentausrüstung in Dauerstadien von vielen Grünalgen bisher übersehen wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst die Pigmentzusammensetzung von Dauerstadien der bereits gut untersuchten Grünalgen *Muriella zofingiensis* und *Scenedesmus rubescens* durch Vergleich mit dem Ketocarotinoidmuster aus Dauerstadien von *C. reinhardtii* und *Fritschiella tuberosa* reevaluiert und dabei erstmals das Vorkommen signifikanter Mengen an 4-Ketolutein nachgewiesen. Außerdem zeigte sich, dass die als bisheriger Modellorganismus der Ketocarotinoidbiosynthese in Grünalgen sehr gut untersuchte Alge *Haematococcus pluvialis* eher eine Ausnahme darstellt, da ihre Dauerstadien als einzige der hier untersuchten Algen nur minimale Mengen von 4-Ketolutein aufwiesen. Diese Beobachtungen machen es sehr wahrscheinlich, dass die Fähigkeit zur Bildung von 4-Ketolutein unter den Grünalgen wesentlich weiter verbreitet ist als bisher angenommen. Das sekundäre Carotinoid 4-Ketolutein kam in den Dauerstadien der Grünalgen neben seiner freien Form ausschließlich als Monoacyl ester vor, im Gegensatz zu Astaxanthin, das als mono- und diacylierte Form auftrat.

Über die Analyse der Pigmentausrüstung hinaus konnten die entscheidenden Schritte des Synthesewegs der Ketocarotinoide in *C. reinhardtii* durch funktionelle Charakterisierung der beteiligten Enzyme in Bakterien aufgeklärt werden. Als Basis für die Charakterisierungen wurde ein umfangreiches Portfolio von carotinogenen *E. coli*-Bakterien etabliert, darunter  $\alpha$ -Carotin und Lutein produzierende Stämme, die bisher nicht zur Verfügung standen. Das wurde durch die Klonierung der Lycopinzyklase (OluLCY) aus der Grünalge *Ostreococcus lucimarinus* möglich, die eine Sonderrolle unter den Zyklasen einnimmt, da sie die Lycopin- $\beta$ -Zyklase und Lycopin- $\epsilon$ -Zyklase in einem Fusionsenzym vereint. Vorteile dieses Fusionsenzym sind die Expressionskontrolle durch nur einen Promotor und die weitgehend

konstante Stöchiometrie seiner Produkte  $\alpha$ -Carotin und  $\beta$ -Carotin, was die OluLCY für die biotechnologische Anwendung prädestiniert.

Die funktionelle Charakterisierung der Carotinoidbiosyntheseenzyme aus *C. reinhardtii* umfasste das Schlüsselenzym der Ketocarotinoidbiosynthese, die  $\beta$ -Carotin-Ketolase (BKT), sowie die Carotinoid-Hydroxylasen CHYB, CYP97A5 und CYP97C3. Dabei wurde erstmals für ein BKT-Enzym aus Grünalgen nachgewiesen, dass es nicht nur die Ketolierung von  $\beta$ -Carotin zu Canthaxanthin und von Zeaxanthin zu Astaxanthin, sondern auch die Bildung der von  $\alpha$ -Carotin abgeleiteten Ketocarotinoide wie 4-Keto- $\alpha$ -Carotin und 4-Ketolutein katalysieren kann.



## 6. Literaturverzeichnis

**Abe, J., Kubo, T., Saito, T., Matsuda, Y.** (2005). The regulatory networks of gene expression during the sexual differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*, as analyzed by mutants for gametogenesis. *Plant and Cell Physiology*. **46**, 312-316.

**Abe, J., Kubo, T., Takagi, Y., Saito, T., Miura, K., et al.** (2005). The transcriptional program of synchronous gametogenesis in *Chlamydomonas reinhardtii* *Current Genetics*. **46**, 304-315.

**Bai, L., Kim, E.H., DellaPenna, D., Brutnell, T.P.** (2009). Novel lycopene epsilon zyklase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis *Plant Journal* **59**, 588–599.

**Baranyai, M., Molnar, P., Szabolcs, J., Radics, L., Kajtar-Peredy, M.** (1981). Determination of the geometric configuration of the polyene chain of mono-*cis* C40 carotenoids II: A <sup>13</sup>CNMR study of mono-*cis* luteins and mono-*cis* capsanthins. *Tetrahedron*, **37**, 203-207.

**Baroli, I., Do, A.D., Yamane, T., Niyogi, K.K.** (2003). Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. *Plant Cell*. **15**, 992–1008.

**Bauch, M.** (2007). Funktionelle Charakterisierung von Carotinoidbiosyntheseenzymen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. *Diplomarbeit, FB Biologie, JGU Mainz*.

**Beck, C. F., Acker, A.** (1992). Gametic differentiation of *C. reinhardtii* : Control by nitrogen and light. *Plant Physiol*. **98**, 822-826.

**Becker, B., Marin, B.** (2009). Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Ann. Bot.* **103**, 999-1004.

**Berset, D., Pfander, H.** (1985). Investigation of the carotenoid composition in the petals of a garden hybrid *Narcissus* cvv 'Golden-Harvest'. *Helvetica Chimica Acta* **68**, 1149-54.

**Bjørnland, T. & S. Liaaen-Jensen** (1989). Distribution patterns of carotenoids in relation to chromophyte phylogeny and systematics. in: Green, J.C., B.S.C. Leadbeater, & W.L. Diver. *The Chromophyte Algae: Problems and perspectives*. Systematics Association. Clarendon Press, Oxford. **38**, 37-60.

**Boussiba, S.** (2000). Carotenogenesis in the green alga *H. pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum* **108**, 111-117.

**Brinda, B.R., Sarada, R., Kamath, B.S., Ravishankar, G.A.** (2004). Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*—cultural and regulatory aspects. *Curr. Sci.* **87**, 1290–1295.

**Britton, G.** (1998). Overview of carotenoid biosynthesis. *In: Carotenoids* (eds G. Britton, S. Liaaen Jensen & H. Pfander), pp. 13–148. Birkhäuser, Basel, Switzerland.

**Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H.** (1995). Carotenoids. Vol. 1B: Spectroscopy, Birkhäuser.

**Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H.** (2004). Carotenoids. Handbook, Birkhäuser.

**Buchecker, R., Eugster, C. H., Weber, A.** (1978). Absolute Konfiguration von  $\alpha$ -Doradexanthin und von Frittschiellaxanthin, einem neuen Carotinoid aus *Frittschiella tuberosa* IYENG. *Helvetica Chimica Acta* **61**, 1962-1968.

**Cavalier-Smith, T.** (1976). Electron microscopy of zygospore formation in *C. reinhardtii*. *Protoplasma* **87**, 297–315.

**Ceron, M.C., García-Malea, M.C., Rivas, J., Acien, F.G., Fernandez, J.M., Del Río, E., Guerrero, M.G., Molina, E.** (2007). Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 1112–1119.

**Choi, S.K., et al.** (2007). Characterization of two beta-carotene ketolases, CrtO and CrtW, by complementation analysis in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**, 1335-1341.

**Cordero, B.F., Obratsova, I., Martín, L., Couso, I., León, R., Vargas, M.A., Rodríguez, H.** (2010). Isolation and characterization of a lycopene  $\beta$ -cyclase gene from the astaxanthin-producing green alga *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **46**, 1229–1238.

**Cunningham, F.X. Jr., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K.A., DellaPenna, D., Gantt, E.** (1996). Functional analysis of the  $\beta$  and  $\epsilon$  lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**, 1613–1626.

**Cunningham, F.X. und E. Gantt** (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 557-583.

**Czygan, F. C.** (1968). Secondary carotenoids in green algae. I. Chemistry, occurrence, and factors controlling the biogenesis of these polyenes. *Arch. Mikrobiol.* **61**, 81-102.

**Das, A., Yoon, S.H., Lee, S.H., Kim, J.Y., Oh, D.K., Kim, S.W.** (2007). An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 505-512.

**Del Río, E., Acien, F.G., García-Malea, M.C., Rivas, J., Molina-Grima, E., Guerrero, M.G.** (2005). Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. *Biotechnol, Bioeng*, **91**, 808–815.

**Elbers** (2011). Heterologe Expression und funktionelle Charakterisierung von Cytochrom P450-Carotenoidhydroxylasen aus *C. reinhardtii*, *Diplomarbeit, FB Biologie, JGU Mainz*.

**Farré, G., Sanahuja, G., Naqvi, S., Bai, C., Capell, T., Zhu, C., Christou, P.** (2010): Travel advice on the road to carotenoids in plants. *Plant Science* **179**, 28-48.

**Fernandez-Gonzalez, B., Sandmann, G., Vioque, A.** (1997). A new type of asymmetrically acting beta-carotene ketolase is required for the synthesis of echinenone in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 9728-9733.

- Fiore, A., Dall'osto, L., Fraser, P.D., Bassi, R., Giuliano, G.** (2006). Elucidation of the beta-carotene hydroxylation pathway in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **580**, 4718-22.
- Francis, G.W., Strand, L.P., Lien, T., Knutsen, G.** (1975). Variations in the carotenoid content of *C. reinhardtii* throughout the cell cycle. *Arch. Microbiol.* **104**, 249-254.
- Fraser, P.D., Miura, Y. and Misawa, N.** (1997). *In Vitro* characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *The Journal of Biological Chemistry.* **272**, 6128–6135.
- Fraser, P.D., Shimada, H., Misawa, N.** (1998). Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay. *Eur. J. Biochem.* **252**, 229–236.
- Goodenough, U., Lin, H., Lee, J.-H.** (2007). Sex determination in *Chlamydomonas*. *Sem. Cell Dev. Biol.* **18**, 350-361.
- Goodwin, T. W.** (1980). *The Biochemistry of the Carotenoids, Vol. I: Plants*; 2nd ed. Chapman & Hall, London/New York.
- Goodwin, T.W.** (1984). *The Biochemistry of the Carotenoids, Vol. II: Animals*; 2nd ed. Chapman & Hall, London, New York.
- Grewe, C.** (2009). Untersuchungen zur Astaxanthin-Biosynthese in den Grünalgen *Scenedesmus* sp. und *Haematococcus pluvialis*. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- Grossman, A.R., Harris, E. E., Hauser, C., Lefebvre, P. A., Martinez, D., Rokhsar, D., Shrager, J., Silflow, C. D., Stern, D., Vallon, O., Zhang, Z.** (2003) *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroads of genomics. *Eukaryotic Cell* **2**, 1137-1150.
- Grossman, A.R., Lohr, M., und Im, C.S.** (2004). *C. reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 119-173.
- Grünewald, K., Eckert, M., Hirschberg, J., Hagen, C.** (2000). Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae). *Plant Physiol.* **122**, 1261–1268.
- Grünewald, K., Hagen C.** (2001a).  $\beta$ -carotene is the intermediate exported from the chloroplast during accumulation of secondary carotenoids in *H. pluvialis*. *Journal of Applied Phycology* **13**, 89–93.
- Grünewald, K., Hagen, C.** (2000). Extrusion of secondary carotenoid containing vesicles from flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales; Chlorophyceae). *J. appl. Botany* **74**, 141-144.
- Grünewald, K., Hagen, C., Braune, K.** (1997). Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris*. *Eur. J. Phycol.* **32**, 387–392.
- Grünewald, K., Hirschberg, J., Hagen, C.** (2001b). Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *H. pluvialis*. *The Journal of Biological Chemistry* **8**. 6023–6029.

- Grung, M., D'Souza, M. L., Borowitzka, M., Liaaen-Jensen, S.** (1992). Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. *J. appl. Phycol* **4**, 165-171.
- Harris E.H.** (1989). The Chlamydomonas sourcebook. Academic Press, San Diego, CA.
- Harris, E.H.** (2001). Chlamydomonas as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 363-406.
- Harris, E.H.** (2009). The Chlamydomonas Sourcebook, 2nd ed; Vol. 1: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use. Academic Press, Amsterdam.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F.M.** (2006). Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 185-196.
- Hirschberg, J.** (1998). Molecular biology of carotenoid biosynthesis. In Carotenoids (eds G. Britton, S. Liaaen Jensen and H. Pfander), pp. 149–194. Birkhäuser, Basel, Switzerland.
- Howitt, C.A., Pogson, B.J.** (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ.* **29**, 435-445.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A.** (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant. J.* **54**, 621–639.
- Huang J, Chen F, Sandmann G** (2006). Stress-related differential expression of multiple  $\beta$ -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology* **122**, 176–185.
- Huang, J.C., Chen, F., Sandmann, G.** (2006a). Stress-related differential expression of multiple  $\beta$ -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Biotechnol.* **122**, 176–185.
- Huang, J.C., Wang, Y., Sandmann, G., Chen, F.** (2006b). Isolation and characterization of a carotenoid oxygenase gene for *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 473–479.
- Inhoffen H. H., Bohlmann, F. und Rummert, G.** (1951). Über die Stereo-isomerisierung des 9,9'-mono-*cis*- $\beta$ -Carotins. *Liebigs Ann. Chem.* **571**, 75-83.
- Ittah, Y., Kanner, J., Granit, R.** (1993). Hydrolysis study of carotenoid pigments of paprika by HPLC/photodiode array detection. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 899-901.
- Yuan, J.P. and Chen, F.** (1997). Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection, *Biotechnology Techniques.* **11**, 455–459.
- Yuan, J.P. and Chen, F.** (1999). Isomerization of *trans*-astaxanthin to *cis*-isomers in organic solvents, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **47**, 3656–3660.
- Jin, E., Lee, C.G. and Polle, J.E.W.** (2006). Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, regulation, and biotechnology. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* **16**, 821-831.
- Johnson, E. A., An, G. H.** (1991). Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.* **11**, 297-326.

- Kajiwara, S., T. Kakizono, T. Saito, K. Kondo, T. Ohtani, N. Nishio, S. Nagi und N. Misawa** (1995) Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *H. pluvialis*, and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.* **29**, 343–352.
- Khachik, F., Beecher, G.R. and Whittaker, N.F.** (1986). Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **34**, 603–616.
- Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J.M., Vogt, K. Lederer, M.O., Breithaupt, D.E., von Lintig, J.** (2001). Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 14110–14116.
- Kim, J., Smith, J.J., Tian, L., DellaPenna, D.** (2009). The evolution and function of carotenoid hydroxylases in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **50**, 463–479.
- Kim, J., und DellaPenna, D.** (2006). Defining the primary route for lutein synthesis in plants: The role of *Arabidopsis* carotenoid  $\beta$ -ring hydroxylase CYP97A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 3474–3479.
- Kindle, K. L.** (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. USA* **87**, 1228–1232
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y., und Tsuji, Y.** (1997). Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *H. pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 351–356.
- Kobayashi, M., und Sakamoto, Y.** (1999). Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *H. pluvialis*. *Biotechnol. Lett.* **21**, 265–269.
- Kubo, T., Abe, J., Oyamada, T., Ohnishi, M., Fukuzawa, H., et al.** (2008). Characterization of novel genes induced by sexual adhesion and gamete fusion and of their transcriptional regulation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant and Cell Physiology* **49**, 981–993.
- Kuhn, R. and Grundmann, C.** (1934). Über Rubixanthin, ein neues Xanthophyll der Formel  $C_{40}H_{56}O$ . *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **67**, 339–344.
- Ledford, H.K., Niyogi, K.K.** (2005). Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell Environ.* **28**, 1037–1045.
- Lee, J.H., Lin, H., Joo, S., Goodenough, U.** (2008). Early sexual origins of homeoprotein heterodimerization and evolution of the plant KNOX/BELL family. *Cell* **133**, 829–840.
- Lemoine, Y., Schoefs, B.** (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research.* **106**, 155–177.
- Lemoine, Y., Rmiki, N.-E., Créach, A., Rachidi, J., Schoefs, B.** (2008). Cytoplasmic accumulation of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Aus Schoefs, B., Plant cell compartments. Research Signpost, Trivandrum*, 251–284.

- Li, Y., Huang, J., Sandmann, G., Chen, F.** (2009). High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **45**, 635–641.
- Li, Y., Huang, J.L., Sandmann, G., Chen, F.** (2008b). Glucose sensing and the mitochondria alternative pathway are involved in the regulation of astaxanthin biosynthesis in the dark-grown *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae). *Planta* **228**, 735–743.
- Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F., Hu, Q.** (2008a). Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Plant. Physiol.* **165**, 1783–1797.
- Lichtenthaler, H.K.** (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 47-65.
- Linden** (1999). Carotenoid hydroxylase from *H. pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. *Biochem. Biophys. Acta* **1446**, 203–212.
- Lohr, M.** (2009). Carotenoids. *In: The Chlamydomonas Sourcebook, Vol. 2: Chlamydomonas in the Plant Sciences* (ed. D. Stern). Elsevier. 799-818
- Lohr, M., C. S. Im, und Grossman, A.** (2005). Genome-based examination of chlorophyll and carotenoid biosynthesis in *C. reinhardtii*. *Plant Physiology* **138**, 490-515.
- Lohr, M., Schwender, J., Polle, J.** (2011). Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: a spotlight on algae. *Plant Science*, doi: 10,1016/j.plantsci.2011.07.018
- Lotan, T. und Hirschberg, J.** (1995). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding  $\beta$ -C-4-oxygenase that converts  $\beta$ -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *H. pluvialis*. *FEBS Lett.* **364**, 125–128.
- Marx, M., Sturparic, M., Schieber, A., Carle, R** (2003). Effects of thermal processing on *trans*–*cis*-isomerization of  $\beta$ -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations, *Food Chemistry* **83**, 609–617.
- Margalith, P.Z.** (1999). Production of Ketocarotenoids in Microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 431-438.
- Matsuno, T., Katsuyama, M., Maoka, T., Hirono, T. and T Komori, T.** (1985). Reductive metabolic pathways of carotenoids in fish (3S,3-S)-astaxanthin to tunaxanthin A, B and C., *Comp. Biochem. Physiol.* **80B** 779–789.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., et al.** (2007) The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**, 245-50.
- Miao, F., Dayan, L., Li, Y., Zeng, M.** (2006). Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **352**, 176–181.
- Miao, F., Lu, D., Zhang, C., Zuo, J., Geng, Y., Hu, H., Li, Y.** (2008): The synthesis of astaxanthinesters, independent of the formation of cysts, highly correlates with the synthesis of fattyacids in *Haematococcus pluvialis*. *Science in Chine Series C: Life Science.* **51**, 1094-1100.

- Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. and Harashima, K.** (1990). Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 6704-6712.
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T. and Miki, W.** (1995). Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* **177**, 6575-6584.
- Misawa, N.** (2009). Pathway engineering of plants toward astaxanthin production. *Plant Biotechnol* **26**, 93-99.
- Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, Schwach F, Karkare S, et al.** (2009). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, **58**, 165-174.
- Moulin, P., Lemoine, Y., Schoefs, B.** (2010) Modifications of the carotenoid metabolism in plastids: a response to stress conditions. In: Pessaraki M (ed) Handbook of plant and crop stress. 3rd, Taylor and Francis, New York, 407–433.
- Müller, P., Li, X.P., Niyogi, K.K.** (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* **125**, 1558-1566.
- Nishida, Y.; Adachi, K.; Kasai, H.; Shizuri, Y.; Shindo, K.; Sawabe, A.; Komemushi, S.; Miki, W.; Misawa, N.** (2005) Elucidation of a carotenoid biosynthesis gene cluster encoding a novel enzyme, 2,2'- $\beta$ -hydroxylase, from *Brevundimonas* sp. strain SD212 and combinatorial biosynthesis of new or rare xanthophylls. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 4286–4296.
- Niyogi, K. K.** (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 333-59.
- Orosa M, Torres E, Fidalgo P, Abalde J** (2000). Production and analysis of carotenoids in green algae. *Journal of Appl. Phycol.* **12**, 553-556.
- Palenik et al.** (2007). The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *PNAS* **104**, 7705-7710.
- Polle, J.E.W., Niyogi, K.K., Melis, A.** (2001). Absence of lutein, violaxanthin and neoxanthin affects the functional chlorophyll antenna size of photosystem-II but not that of photosystem-I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 482-491.
- Pörschke, Y.** (2011). Herstellung hybrider Lycopinzyklase-Fusionsproteine und Untersuchung ihres Produktspektrums, *Staatsexamensarbeit, FB Biologie, JGU Mainz*.
- Pritchard, MP., McLaughlin, L. and Friedberg, T.** (2006) Establishment of Functional Human Cytochrome P450 Monooxygenase Systems in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol.*, 19-29.
- Remias, D., Lütz-Meindl, U., Lütz, C.** (2005). Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *Eur. J. Phycol.* **40**, 259–268.

- Renstrom, B., Liaaen-Jensen, S.** (1981). Fatty acid composition of some esterified carotenols. *Comp Biochem Physiol.* **69**, 625–627.
- Richter G.** (1998). Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels, 6. Auflage, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York.
- Rohmer, M.** (2003). Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. *Pure and Applied Chemistry* **75**, 375-387.
- Sambrook J, and Russel D.W.** (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santos, M.F., und Mesquita, J.F.** (1984). Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) *Rostafinski* (Volvocales). I. Some aspects of carotenogenesis. *Cytologia* **49**, 215-228.
- Schlösser, U.G.** (1994). SAG – Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen. Catalogue of strains 1994. *Bot. Acta.* **107**, 113-186.
- Schmidt, G.** (2007). Untersuchungen zur Biosynthese von Ketocarotinoiden in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, *Staatsexamensarbeit, FB Biologie, JGU Mainz*.
- Schoefs, B., Rmikia, N.E., Rachadia, J., Lemoine, Y.** (2001). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. *FEBS Letters* **500**, 125-128.
- Schopfer, P. und Brennicke, A.** (2006). Pflanzenphysiologie. *Spektrum Akademischer Verlag München*, 6. Auflage.
- Schwender, J., Gemünden, C. and Lichtenthaler, H.** (2001). Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *Planta* **212**, 416-423.
- Schwinn, C.**(2007) Entwicklung eines HPLC-gestützten Massenscreening-Verfahrens zur Identifizierung von Pigmentmutanten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. *Diplomarbeit FH Gießen-Friedberg*.
- Shuman, S.** (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269**, 32678-32684.
- Sirevag, R., Levine, R. P.** (1973) Transcription and translation for. carotenoid synthesis in. *C. reinhardtii*. *Planta* **111**, 73-84.
- Steinbrenner, J., Linden, H.** (2003). Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. *Plant Mol Biol.* **52**, 343–356.
- Stransky, H., Hager, A., 1970.** Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllzyklus in den verschiedenen Algenklassen. *Archiv Mikrobiologie*, **73**, 315-323.
- Sun, T.H., Liu, C.Q., Hui, Y.Y., Wu, W.K., Zhou, Z.G., Lu, S.** (2010). Coordinated regulation of gene expression for carotenoid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 868–878.



- Sun, Z., Gantt, E., Cunningham, F.X.** (1996). Cloning and functional analysis of the  $\beta$ -carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **271**, 24349–24352.
- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M., und DellaPenna, D.** (2004). The *Arabidopsis* LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for carotenoid epsilon-ring hydroxylation activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 402–407.
- Ukibe, K., Katsuragi, T., Tani, Y., Takagi, H.** (2008). Efficient screening for astaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.* **286**, 241-248.
- Vidhyavathi, R., Venkatachalam, L., Sarada, R., Ravishankar, G.A.** (2008). Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *J. Exp. Bot.* **59**, 1409–1418.
- Wackenroder, H.** (1831). Über das Oleum radices. Dauci Aetherum, das Carotin, den Carotenzucker und den officinellen saucus Dauci, usw. Diss. de Anthelminticis Göttingen (1826): Geiger's Mag. Pharm. **33**, 144-172. 1831.
- Wang, B., Zarka, A., Trebst, A., und Boussiba, S.** (2003). Astaxanthin accumulation in *H. pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *J. Phycol.* **39**, 1116-1124.
- Weber, A.** (1975). Chlorophylle und Carotinoide der Chaetophorineae (Chlorophyceae; Ulotrichales) 2. Der Einfluss unterschiedlicher Stickstoffkonzentrationen auf die Pigmentgarnitur und die Morphogenese der Grünalge *Frittschiella tuberosa*. *Arch. Microbiol.* **102**, 45-52.
- Werner S** (2011). Nachweis und Charakterisierung der Ketocarotinoidakkumulation in Zygosporien des Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii*. *Dissertation, JGU Mainz*.
- Young, A. and Britton, G.** (1993). Carotenoid in photosynthesis, Chapman and Hall, London.
- Yuan, J. P.; Gong, X. D.; Chen, F.** (1997) Separation and analysis of carotenoids and chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by high-performance liquid chromatography photodiode array detection. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1952–1956.
- Yuan, J. P., Chen, F.** (1997). Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnol. Tech.* **11**, 455-459.
- Yuan, J. P., Chen, F.** (1998). Chromatographic separation and purification of *trans*-astaxanthin from the extracts of *H. pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 1952–1956.
- Yuan, J. P., Chen, F.** (1999). Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 31-35.
- Zechmeister, L.** (1962). *Cis-trans isomeric carotenoids, vitamins A and arylpolyenes*, Springer Verlag, Wien.

**Zhao, H., Lu, M., Singh, R. and W. J. Snell** (2001). Ectopic expression of a mating type plus-specific homeodomain protein in mating type minus gametes in *Chlamydomonas* initiates zygote development without gamete fusion. *Genes & Development* **15**, 2767-2777.

**Zhekisheva, M., Zarka, A., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. and Boussiba, S.** (2005): Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **41**: 819–826.

**Zhong, Y.J., Huang, J.C., Liu, J., Li, Y., Jiang, Y., Xu, Z.F., Sandmann, G., Chen, F.** (2011). Functional characterization of various algal carotenoid ketolases reveals that ketolating zeaxanthin efficiently is essential for high production of astaxanthin in transgenic *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **62**, 3659–3669.

## 7. Anhang

### A.1. Verwendete Geräte

#### Allgemeine Geräte

pH-Meter	HI221, Hanna Instruments, (Bedfordshire, UK)
Pipetten:	Pipetman, Gilson (Middleton, WI, USA)
Kühlzentrifugen:	Avanti™ J-25, Beckmann (München); Rotor: JA25.50 Megafuge 1.0, Heraeus Sepatech (Hanau), Rotor: 2150
Magnetrührer:	IKAMAG RCT, IKA Labortechnik; Staufen
Photometer:	U-2000 Spektrophotometer, Hitachi (Tokyo, Japan) Biophotometer V1.20, Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifugen:	Mikro 24-48, Hettich (Tuttlingen) Mikro 12-24, Hettich (Tuttlingen)
Ultraschallbad:	Sonorex TK 52, Bandelin (Berlin)
Vortexer:	IKAM S2 Minishaker, IKA Works Inc (Wilmington, USA)
Waagen:	Präzisionswaage Mettler PM460, Albert Jordan (Frankfurt) Analysenwaage A200S, Sartorius (Göttingen)

#### Geräte für mikrobiologische Arbeiten

Autoklav:	Varioklav Dampfsterilisator (Typ 500), H&P Labortechnik (Fachhandel, Labotec, Oberschleissheim)
Brutschränke:	BE 400, Memmert (Schwabach) BE 500, Memmert (Schwabach)
Inkubationsschüttler:	TH 15 Inkubationshaube mit KS 15 A Kompaktschüttler, E. Bühler (Hechingen) Tischrundschtüttler Certomat®H mit Inkubationshaube, Satorius (Göttingen)
Kulturrad:	Rotator, Helmut Saur Laborbedarf (Reutlingen)
Sterilbank:	Laminar Flow Workstation, Microflow, MDH (Hampshire, UK) Laminar-Air-Flow Werkbank Kbf-2, Prettl KG (Pfullingen)

Zellhomogenisator: Glasmühle, SMK, B. Braun (Melsungen)  
Mini-Beadbeater, (Biospec Produkts(Bartlesville, USA)  
Zählkammer: C-Chip DHC-NO1, Peqlab (Erlangen)

### **Geräte für molekularbiologische Arbeiten**

Elektrophorese: GENterphorese-Kammer, GENterprise GENOMICS (Mainz)  
Horizon™ 11·14 Gel Elektrophoresis Apparatus, BRL Life  
Technologies  
Gelkammer verschiedene Größen, Peqlab (Erlangen)  
Geldokumentation: GelDoc 1000, Bio-Rad (München)  
Heizblock: Techne Dri-Block DB3, Techne (Cambridge, UK)  
Mikrowelle: NN-5256/5206, Panasonic; Hamburg  
Software: Molecular Analyst, Bio-Rad (München)  
Spannungsquelle: Biometra Standard Power Pack P25, Biometra (Göttingen)  
Thermocycler: TGradient, Biometra (Göttingen)

### **Geräte für Analytische Arbeiten**

#### **HPLC Waters**

Detektor: Photo-Diode Array Detector, Waters 2996 (Waters)  
Säulen: EC 250/4 Nucleosil 300-5 C18 (Machery-Nagel)  
Vorsäule CC 8/4 Nucleosil 300-5 C18 (Machery-Nagel)  
Chromolith Performance RP-18e 100-4,6mm (Merck)  
Chromolith Column Coupler 10-32 (Merck)  
Chromolith SpeedROD RP-18e 50-4,6mm (Merck)  
Chromolith Guard Cartridge Kit RP-18e 100-4,6mm (Merck)  
Separationsmodul: Waters 2795 (Waters)  
Software: Empower Pro, Build: 1154 (Waters)

## A.2. Sequenzen der Vektoren mit den zu charakterisierenden Genen

### pBAD\_CrBKT5.1

ORF: 346-1804

0-300 [...]

```
301 CTAGAAATAA TTTTGTTTAA CTTTAAGAAG GAGATATACA TACCCATGGG
351 CTCTGGATCC GGTGATGACG ATGACAAGCT CGCCCTTATG GGCCCTGGGA
401 TACAACCCAC TTCCGCGCGA CCGTGTTCTA GGACCAAACA CAGTCGATTT
451 GCGCTACTTG CCGCAGCGCT GACCGCACGA CGCGTCAAGC AGTTCACGAA
501 GCAGTTCGCG TCGCGTAGGA TGGCGGAGGA CATACTGAAG CTGTGGCAGC
551 GCCAATATCA CCTGCCGCGC GAGGATTCTG ACAAGCGCAC GCTGCGCGAG
601 CGCGTTCACC TGTACCGCCC GCCGCGTTCA GACCTAGGTG GCATTGCGGT
651 CGCTGTGACA GTCATCGCGC TGTGGGCGAC GCTGTTTGTG TACGGGCTGT
701 GGTTCGTCAA GCTGCCATGG GCGCTCAAAG TGGGCGAGAC AGCCACGTCC
751 TGGGCAACCA TTGCTGCTGT ATTCTTTAGC CTGGAATTCC TTTACACCGG
801 GCTCTTCATC ACCACGCACG ACGCGATGCA TGGCACCATC GCGCTGCGCA
851 ACCGGCGCCT GAACGACTTT CTGGGCCAGC TGGCAATCAG CCTATACGCC
901 TGGTTTGA CTCCGTCCT GCACCGCAAG CACTGGGAGC ACCACAACCA
951 CACCGGGGAG CCGCGTGTGG ATCCGGACTT CCACCGCGGC AACCCCAACC
1001 TGGCGGTGTG GTTCGCGCAG TTCATGGTGT CGTACATGAC CCTCAGCCAG
1051 TTCCTCAAGA TCGCGGTCTG GTCCAACCTG CTGCTGCTGG CGGGTGCGCC
1101 GCTGGCCAAC CAGCTGCTGT TCATGACGGC GCGGCCCATC CTGTCCGCCT
1151 TCCGCCTGTT CTACTACGGC ACCTACGTGC CGCACCACCC GGAGAAGGGG
1201 CACACCGGCG CCATGCCCTG GCAGGTATCC CGCACCAGCT CCGCCTCCCG
1251 GCTGCAGTCG TTCCTCACCT GCTACCACTT CGACCTGCAC TGGGAGCACC
1301 ACCGCTGGCC CTACGCGCCC TGGTGGGAGC TGCCCAAGTG CCGCCAGATT
1351 GCCCGCGGCG CAGCCCTGGC GCCCGGGCCG CTGCCCGTGC CGGCAGCGGC
1401 GCGCGCTACA GCGCCACCG CGGCGGCGGC AGCAGCAGCT ACAGGCAGCC
1451 CCGCTCCCGC CAGCCGAGCA GGGTCAGCTT CCTCCGCCTC CGCAGCGGCC
1501 TCCGGATTTG GATCCGGACA CAGCGGCTCT GTGGCTGCGC AGCCGCTGTC
1551 TTCGCTGCCC TTGCTGAGCG AGGGCGTGAA GGGGTGGTGG GAGGGGGCGA
1601 TGGAGTTGGT GGCAGGTGGC AGCAGCAGCG GCGGTGGTGG AGAGGGCGGC
1651 AAGCCGGGCG CGGGGGAGCA CGGGCTGCTG CAGCGGCAGC GGCAGCTGGC
1701 GCCTGTTGGC GTGATGGCTA AGGGCGAGCT TGAAGGTAAG CCTATCCCTA
1751 ACCCTCTCCT CGGTCTCGAT TCTACGCGTA CCGGTCATCA TCACCATCAC
1801 CATTGAGTTT AAACGGTCTC CAGCTTGGCT GTTTTGGCGG ATGAGAGAAG
1851 ATTTTCAGCC TGATACAGAT TAAATCAGAA CGCAGAAGCG GTCTGATAAA
1901 ACAGAATTTG CCTGGCGGCA GTAGCGCGGT GGTCCCACCT GACCCCATGC
1951 CGAACTCAGA AGTGAAACGC CGTAGCGCCG ATGGTAGTGT GGGGTCTCCC
2001-5459 [...]
```

### pBAD\_CHYB

ORF: 346-1360

0-300 [...]

```
301 CTAGAAATAA TTTTGTTTAA CTTTAAGAAG GAGATATACA TACCCATGGG
351 CTCTGGATCC GGTGATGACG ATGACAAGCT CGCCCTTATG CTGGCTTCGC
401 GTCCTGCTGT CGCGCTAGGG GCACGCGCCC AGCCCAGGT GTTGCGCCCA
451 ACCCTGGTGC CTCGACCTGG AATGGTGTCA AACCTACGGC TGCAGCCTGT
501 GAAGTTCGCG GACCCCATTTG TGGCGTCGGA GACCTCGCAG GTCATGGAGG
551 CGCCGCAGGA GAAGAAGCTA TCCGAATTTG AGCTCAAACG CCTCGAGCGC
601 AAGCAGCAAC GCGCCCAAGA GGCCGCCACC TACAAGTTCT CTGCCATCGC
651 CGCGACGGTG CTGGTCTTGA GCATCGCCGT GGTGTCACC TACTACCGCT
701 TCGCCTGGCA CTTTGCCGAG GACGGCGACC TGCCCGTGGG CGAGATGGCG
751 GCGACGCTGC TGCTGGTGTG TGGCGGCATG TTCGGCATGG AGATGTACGC
801 CCGCTTCGCG CACAAGGTGC TGTGGCACGA CTTTGAGCCG GGCTGGGCGC
```

851 TGCACAAGAG CCACCACGAG CCGCGCACCG GCCCCTTTGA GCTCAACGAC  
 901 ATCTACGCCG TCGCCAACGC CCTGCCCGCA ATGGCGCTGT GCGCCTACGG  
 951 CTTCTTCACG CCGCACGTGA TCGGCGGCGT GTGCTTCGGC GCGGGTCTGG  
 1001 GCATCACGCT GTTCGGCATC GCCTACATGT TCTTCCACGA CGGCCTGGTG  
 1051 CACCGCCGCT TCCCCGTGGG GCCCATCGCC AACCTGCCGT ACATGAAGCG  
 1101 CATCATGGTG GCTCATCAGA TCCACCACAC CAACAAGTTC GCGGGCGTGC  
 1151 CCTTCGGCAT GTTTCTGGGC GTGCAGGAGC TGGAGGCGGT GCCGGGCGGC  
 1201 AAGGAGGAGC TGGACAAGCT CATGGCCGAT CTGGAGGCGC GCGAGGCGGC  
 1251 AGCAGCCAAG GCCGCCGGCT CCTCGAAGGG CGAGCTTGAA GGTAAAGCCTA  
 1301 TCCCTAACC TCTCCTCGGT CTCGATTCTA CGGTACCGG TCATCATCAC  
 1351 CATCACATT GAGTTTAAAC GGTCTCCAGC TTGGCTGTTT TGGCGGATGA  
 1401 GAGAAGATTT TCAGCCTGAT ACAGATTAAC TCAGAACGCA GAAGCGGTCT  
 1451 GATAAAACAG AATTTGCCTG GCGGCAGTAG CGCGGTGGTC CCACCTGACC  
 1501-5015 [...]

### pBAD\_LCYE

ORF: 346-2019

0-300 [...]

301 CTAGAAATAA TTTTGTTTAA CTTTAAGAAG GAGATATACA TACCCATGGG  
 351 CTCTGGATCC GGTGATGACG ATGACAAGCT CGCCCTTTGC CAGGTTGTAT  
 401 CTACGGAGAC TGAGGCACCT ACCATCGTGC TTGACCGGCC CGGGAGGACC  
 451 GTTCAGCCGG AGCTCTCCAT TCCAGCGGCC CTGAATCAAG AAATCCGCGA  
 501 GGGCACTAT GAGGCCGCGC TGGTGAAGGA GCAGGCGAAC AAGGCGGACG  
 551 CCTCTCAAGC GGCAATTGCG TCCGTATTGA AGCCCGCTGA CACCACGGTC  
 601 ACAGCCGATG TGACAATTGT TGGTGCGGGC CCGGCTGGCC TCTTCTGGC  
 651 TGCAGGATTG GGCAAGCGGG GCATGAGCGT GAACGTCCCTC GGCCTGGACG  
 701 TGCCATTGT GAACAACACTAC GCGTGTGGA CGGACGAGTT CGAGGCCCTG  
 751 GGCCTGACCC ATACACTGGA GTGCTCCTGG CCTGATGCCG TGTGCTACTT  
 801 CGGCGAGGGC AACCAGGTGA GCGTGGGCCG CGGCTACGGC CGTGTGAGCC  
 851 GCCGCTGCT GCGTGAGCAC CTGCTCAAGA TCTGCGAGGC GCGGGCGTG  
 901 CGTTTCAGCA GCGCCGAGGT GCGGACATC AAGTTGTGG AGGAGGGCAA  
 951 GCTGACTCAG CTCACCACCA AGGAGGGCGC CGTGTACAGC AGCAGGCTGA  
 1001 CCACTCTGGC TGCGGGTGCC GCTGCCGGCA AGTTCCTGCG CTATGAGGAG  
 1051 GACGCGCCA TTGTCGCCGC ACAACC CGG TACGGCATCG AGGCGGAGGT  
 1101 GGAGGGCTAT GACGCCGCT ACCCGGGCGA CCTCATGACC TTCATGGATT  
 1151 TCAGGCGCCA CCACACCGGC CTGCACGACG GCACGGCGCT CAAATTCGTG  
 1201 CCGGGGCGCC ATCCCAACTC GGGCGACGGC ACGTGGGGCA GCAGCGAGGA  
 1251 GTGCCCTCC TTCCTGTACG CCATGCCGCT GGGCGGCAAG CGCGTGTTC  
 1301 TGGAGGAGAC CTGCCTGGTG GCCAAGCCGG CGCTGCCGTT CGCGGTGCTC  
 1351 AAGCGCCGCC TCACACGCCG CCTCAAGGCC ATGGGCATCT CCGTGACCAA  
 1401 GATCCACGAG GAGGAGTGGG GCTACATCCC TGTGGGCGGC CCCCTGCCGC  
 1451 TGCCCGACCA GTCGGTGACG GCGTTCGGCG CCGCTGCCAA CCTGGTGCAC  
 1501 CCCGCCACCG GCTTCAGCGT CAGCCGCTCC TTCCGTGAGG CGCCGCAGGT  
 1551 GCGGACGAG CTGCAGGCCG CGCTGCGCGA CGGGCTGGAC GTGTCCGCCG  
 1601 CCAGCCGCCG CGTGTGGGAG CGCCTGTGGC CGCAGGAGAA GCGCACGCAG  
 1651 GCCTCCTTCC ACGTGTTCGG CATGGAGCTG CTCGCCACGC TGGACCTCAA  
 1701 CGCCACCAAC GACTTCTTCA ACACCTTCTT CCGCCTGCCG CCCTTCTACT  
 1751 GCGCGGGCTT CCTGGCTCT ACGCTCAGCA GCGGGCAGCT GATTGCCTTT  
 1801 GCGCTGGTGG TGTTCACGCT AGCGCCCTGG AACATCAAGT ACAAGCTCAT  
 1851 TGAGCATCTG ATCACGGACC CCGCCGGCGG CTACCTCATC CGTGCCTACC  
 1901 AGGCGCAGTG GGACAGCTCT CAACAGGCGC CGTCCGCCGC GACTGCCGCC  
 1951 GCCGTGCTGC TGCTCAGCAA CGAGCTGATG ACGCGCGCGG TGCTCAAGGC  
 2001 GCTGGAGAGC GGCAGCGCGA AGGGCGAGCT TGAAGGTAAG CCTATCCCTA  
 2051 ACCCTCTCCT CGGTCTCGAT TCTACGCGTA CCGGTCATCA TCACCATCAC  
 2101 CATTGAGTTT AAACGGTCTC CAGCTTGGCT GTTTTGGCGG ATGAGAGAAG  
 2151 ATTTTCAGCC TGATACAGAT TAAATCAGAA CGCAGAAGCG GTCTGATAAA  
 2201 ACAGAATTTG CCTGGCGGCA GTAGCGCGGT GGTCCACCT GACCCCATGC  
 2251-5759 [...]

## pBAD\_LCYB

ORF: 346-2038

0-300 [...]

```
301 CTAGAAATAA TTTTGTTTAA CTTTAAGAAG GAGATATACA TACCCATGGG
351 CTCTGGATCC GGTGATGACG ATGACAAGCT CGCCCTTAAT CTCCTCGTGG
401 GTCAGAAGGA CGCATTTCGG TCCGGGCCGT ATCCTATTCC GCCTGGCCCC
451 GTTGGGCACT TCTACCGCGA GACCGAGAAA TGGCCCACCT CTGAGACCGT
501 TAGGCTTCAG CCGCATGACT TAAACGAGGT AGACTATGTT GACCTGGTGG
551 TGGCTGGCGC GGGCCCGGCT GGTGTCGCGG TGGCCTCCCG CGTCGCTGCC
601 GCGGGCTTCT CAGTTTGCGT TGTCGACCCC GAGCCGCTGG CCCACTGGCC
651 CAACAACAT GGTGTCTGGC TCGATGAGTT CCAGGCGATG GGGCTGGAGG
701 ACTGCCTGCA CGTCATCTGG CCAAGGCCA AGGTCTGGCT CAACAGCGAG
751 GCCGACGGCG AGAAGTTCCT GAACCGCCCC TTCGGCCGCG TGGACCGGCC
801 CAAGCTGAAG CGCATCCTGC TGGAGCGCTG CGTCGCCTCG GCGGTGACGT
851 TCCTTGACGC CAAGGTGTGC GGCCTGAGTC ACGGCGGCGG CTGCAGCGCC
901 GTCAAGCTGG CGGACGGCCG CGAGATCCGC GGCAGCCTGG TCCTGGACGC
951 CACCGGCCAC TCGGCCCGCC TGGTGCAGTA CGACAAGAAG TTCGACCCGG
1001 GCTTCCAGGG CGCGTACGGC ATTGTGGCGG AGGTTGAGTC TCACCCGTTT
1051 GCGTGGACA CCATGCTGTT CATGGACTGG CGCGACGACC ACACGCAGGC
1101 GCCGGGGCTG GAGGCCATGC GCGCAGCCAA CACCGCGCTG CCCACCTTCC
1151 TGTACGCCAT GCCCTTACC AAGAACCTGG TGTTCCTGGA GGAGACCAGC
1201 CTGGTGTGCG GGCCCGCGGT GGACTTCCCC GAGCTCAAGG ACCGCTGCA
1251 GCGCGGCTG CAGCACCTGG GGATCAAGGT GACCAACGTG CTGGAGGAGG
1301 AGTACTGCCT CATCCCCATG GCGGCGTGC TGCCCAAACA CCCACAGCGC
1351 GTGCTGGCCA TTGGCGGCAC AGCCGGCATG GTGCATCCCT CCACGGGCTT
1401 CATGATCAGC CGCATGATGG GCGCGGCGCC CACGGTTGCC GACACCATTG
1451 TGGATCAGCT CAGTCGCCCC GCCGACAAGG CCAGCGAGTC AGGCGCCCCG
1501 CTGCGCCCCT CCAGCGAGGC GGAGGCGGAG TCCATGGCCG CCGCCGTGTG
1551 GGCCGCCACC TGGCCGCTGG AGCGCGTGC GAGCGCGCC TTCTTACCTT
1601 TTGGCATGGA CGTGCTGCTC AAGCTCAACC TGCCGCAGAT CCGGGAGTTC
1651 TTCAGGGCGT TCTTACGCCCT CAGTGAATTC CACTGGCAGG GCTTCTGTG
1701 CACACGCCTG TCGCTGCCGC AGCTGATTGT GTTTGGCCTG ACGCTGTTCT
1751 GGAAGAGCTC CAACCAGGCT CGCGCCAGCC TGCTGCAGCT GGGCATCCCC
1801 GGCCGTGGTG TGATGCTGTC GGGACTGGCG CCCACACTGG GAGGCGGCTA
1851 CTACCCAGAC ACAATGTCGC TCAAGGAGCG CAAGGACGCA GTGGACGCCG
1901 CCGCGCGCTC CGCCGCCGCC GCCGCCCGCG CCGCCGCGGA CGTGGCCAGC
1951 GACGCGCCCG CTTTCGTGTC CGCCAACCTG AGCGGCGCCG ACATGGCGGT
2001 GGTGGAGGTG GTGGAGAAGG CGTTCAGCAC CAGATCTTAA TACGTAATC
2051 TGAAGGGCGA GCTTGAAGGT AAGCCTATCC CTAACCCTCT CCTCGGTCTC
2101 GATTCTACGC GTACCGGTCA TCATCACCAT CACCATTGAG TTTAAACGGT
2151 CTCCAGCTTG GCTGTTTTGG CGGATGAGAG AAGATTTTCA GCCTGATACA
2201 GATTAAATCA GAACGCAGAA GCGGTCTGAT AAAACAGAAT TTGCCTGGCG
2251 GCAGTAGCGC GGTGGTCCCA CCTGACCCCA TGCCGAACTC AGAAGTGAAA
2251-5792 [...]
```

## pBAD\_crtZ\_ΔPrä

ORF: 346-877

0-300 [...]

```
301 CTAGAAATAA TTTTGTTTAA CTTTAAGAAG GAGATATACA TACCCATGGG
351 TATGTTGTGG ATTTGGAATG CCCTGATCGT TTTTCGTTACC GTGATTGGCA
401 TGGAAGTGAT TGCTGCACTG GCACACAAAT ACATCATGCA CGGCTGGGGT
451 TGGGGATGGC ATCTTTCACA TCATGAACCG CGTAAAGGTG CGTTTGAAGT
501 TAACGATCTT TATGCCGTGG TTTTGTGCTG ATTATCGATC CTGCTGATTT
551 ATCTGGGCAG TACAGGAATG TGGCCGCTCC AGTGGATTGG CGCAGGTATG
601 ACGGCGTATG GATTACTCTA TTTTATGGTG CACGACGGGC TGGTGCATCA
651 ACGTTGGCCA TTCCGCTATA TTCCACGCAA GGGCTACCTC AAACGGTTGT
701 ATATGGCGCA CCGTATGCAT CACGCCGTCA GGGGCAAAGA AGGTTGTGTT
```

```

751 TCTTTTGGCT TCCTCTATGC GCCGCCCTG TCAAACTTC AGGCGACGCT
801 CCGGGAAAGA CATGGCGCTA GAGCGGGCGC TGCCAGAGAT GCGCAGGGCG
851 GGGAGGATGA GCCCGCATCC GGAAGTAAA AGGGCGAGCT TGAAGGTAAG
901 CCTATCCCTA ACCCTCTCCT CGGTCTCGAT TCTACGCGTA CCGGTCATCA
951 TCACCATCAC CATTGAGTTT AAACGGTCTC CAGCTTGGCT GTTTTGGCGG
1001-4619 [...]

```

### **pBAD\_crtZ**

```

ORF: 346-922
0-300 [...]
301 CTAGAAATAA TTTTGTTTAA CTTTAAGAAG GAGATATACA TACCCATGGG
351 CTCTGGATCC GGTGATGACG ATGACAAGCT CGCCCTTACC ATGGGTATGT
401 TGTGGATTTG GAATGCCCTG ATCGTTTTTCG TTACCGTGAT TGGCATGGAA
451 GTGATTGCTG CACTGGCACA CAAATACATC ATGCACGGCT GGGGTTGGGG
501 ATGGCATCTT TCACATCATG AACC GCGTAA AGGTGCGTTT GAAGTTAACG
551 ATCTTTATGC CGTGGTTTTT GCTGCATTAT CGATCCTGCT GATTTATCTG
601 GGCAGTACAG GAATGTGGCC GCTCCAGTGG ATTGGCGCAG GTATGACGGC
651 GTATGGATTA CTCTATTTTA TGGTGCACGA CGGGCTGGTG CATCAACGTT
701 GGCCATTCCG CTATATTCCA CGCAAGGGCT ACCTCAAACG GTTGTATATG
751 GCGCACCGTA TGCATCACGC CGTCAGGGGC AAAGAAGGTT GTGTTTCTTT
801 TGGCTTCCTC TATGCGCCGC CCCTGTCAA ACTTCAGGCG ACGCTCCGGG
851 AAAGACATGG CGCTAGAGCG GCGCTGCCA GAGATGCGCA GGGCGGGGAG
901 GATGAGCCCG CATCCGGGAA GTAAAAGGGC GAGCTTGAAG GTAAGCCTAT
951 CCCTAACCTC CTCCTCGGTC TCGATTCTAC GCGTACCGGT CATCATCACC
1001 ATCACCATTG AGTTTAAACG GTCTCCAGCT TGGCTGTTTT GCGGATGAG
1051-4664 [...]

```



### A.3. Sequenzen der Plasmide zur Carotinoidproduktion in *E. coli*

#### pALPHA

```
1 GAATTCGGGA TGAGCATTCA TCAGGCGGGC AAGAATGTGA ATAAAGGCCG
51 GATAAACTT GTGCTTATTT TTCTTTACGG TCTTTAAAAA GGCCGTAATA
101 TCCAGCTGAA CGGTCTGGTT ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAAATGC
151 CTCAAATGT TCTTTACGAT GCCATTGGGA TATATCAACG GTGGTATATC
201 CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCCT TAGCTCCTGA AAATCTCGAT
251 AACTCAAAAA ATACGCCCGG TAGTGATCTT ATTTTCATTAT GGTGAAAAGTT
301 GGAACCTCTT ACGTGCCGAT CAACGTCTCA TTTTCGCCAA AAGTTGGCCC
351 AGGGCTTCCC GGTATCAACA GGGACACCAG GATTTATTTA TTCTGCGAAG
401 TGATCTTCCG TCACAGGTAT TTATTCCGGC CAAAGTGCGT CGGGTGATGC
451 TGCCAACTTA CTGATTTAGT GTATGATGGT GTTTTTGAGG TGCTCCAGTG
501 GCTTCTGTTT CTATCAGCTG TCCCTCCTGT TCAGCTACTG ACGGGGTGGT
551 GCGTAACGGC AAAAGCACCG CCGGACATCA GCGCTAGCGG AGTGTATACT
601 GGCTTACTAT GTTGGCACTG ATGAGGGTGT CAGTGAAGTG CTTTCATGTGG
651 CAGGAGAAAA AAGGCTGCAC CGGTGCGTCA GCAGAATATG TGATACAGGA
701 TATATTCCGC TTCTTCGCTC ACTGACTCGC TACGCTCGGT CGTTCGACTG
751 CGGCGAGCGG AAATGGCTTA CGAACGGGGC GGAGATTTCC TGGAAGATGC
801 CAGGAAGATA CTTAACAGGG AAGTGAGAGG GCCGCGCAA AGCCGTTTTT
851 CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACAAGCATCA CGAAATCTGA CGCTCAAATC
901 AGTGGTGGCG AAACCCGACA GGAATAAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT
951 GGCGGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTTCT GCCTTTCGGT TTACCGGTGT
1001 CATTCCGCTG TTATGGCCGC GTTTGTCTCA TTCCACGCCT GACTCAGT
1051 TCCGGGTAGG CAGTTCGCTC CAAGCTGGAC TGTATGCACG AACCCCCGT
1101 TCAGTCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC
1151 CGGAAAGACA TGCAAAAGCA CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAATTGATTT
1201 AGAGGAGTTA GTCTTGAAGT CATGCGCCGG TTAAGGCTAA ACTGAAAGGA
1251 CAAGTTTTGG TGACTGCGCT CCTCCAAGCC AGTTACCTCG GTTCAAAGAG
1301 TTGGTAGCTC AGAGAACCTT CGAAAAACCG CCCTGCAAGG CGGTTTTTTC
1351 GTTTTCAGAG CAAGAGATTA CGCGCAGACC AAAACGATCT CAAGAAGATC
1401 ATCTTATTTA TCAGATAAAA TATTTCTAGA TTTTCAGTGA ATTTATCTCT
1451 TCAAATGTAG CACCTGAAGT CAGCCCCATA CGATATAAGT TGTAATTTCT
1501 ATGTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG TTTATCACAG
1551 TTAATTTGCT AACGCAGTCA GGCACCGTGT ATGAAATCTA ACAATGCGCT
1601 CATCGTCATC CTCGGCACCG TCACCCTGGA TGCTGTAGGC ATAGGCTTGG
1651 TTATGCCGGT ACTGCCGGG CTCTTGCGGG ATAATTCGGT TAAATTTGAA
1701 TCCTTAAGCC TGCTGCCAGT CACGCCGTCA GGGGCAAAGA AGGTTGTGTT
1751 TCTTTTGGCT TCCTCTATGC GCCGCCCTG TCAAACTTC AAGGCGAGCT
1801 CCGGAAAGA CATGGCGCTA GAGCGGGCGC TGCCAGAGAT GCGCAGGCGC
1851 GGGAGGATGA GCCCGCATCC GGAAGTAAG GCCTGACCA GAGGCGGCCA
1901 GCAGCAGCGT TAATTTTTTC GCGTGGTTCG TTGACTGCCG CTGATCCCAG
1951 GCTTGCTGAC CGGCCTGTTC AACTTTGACA CCTATTTTCC GGTAAACCTG
2001 CTTCGCCGTA GCGATTGCC AGGCGGAACG CAGGGGCAAC CCTGCCAGGC
2051 CGGCTGTGGC AGACAAATAG TAAGTTCTG CTTCCTGCAC CAAACGACGG
2101 GCGATACGGC TCAGCGCTG ACGGTTTTCA GGTGCCGCAT AATTCTCTTT
2151 GTTCAGACCT TCATGCTCCA GCCAGCTTGC CGGCAGATAA CAGCGCCCCG
2201 CATGCGCATC GTCCACAATA TCGCGAGCAA TATTGGTCAA CTGAAATGCC
2251 AGCCCAAGGT CACAGGCGCG GTCCAGCGTG GCGTTATCCC GCACGCCCAT
2301 GATTTGCGCC ATCATCAAGC CGACAACGCC TGCAACGTGA TAGCAATAGC
2351 GCAGCGTATC ATCCAGTTGG CTGTATTGCG CTTCGCGTAC ATCCATGGCG
2401 AAGCCTTCCA GATGATCAAA CGCGTAAGCC GGGGCGATAT CATGAGCCAT
2451 AGCCACTTCC TGAAAAGCCG CAAACGCCGG TTCGTGCATC TGCGATCCTG
2501 CATAGGCCTG GCGCGTTTTT ATCTCAAGTT GCATCAGACG TTGTTCCGGC
2551 GTTTGTAAGG CAGGCTGCCG GGCCTGAAAG CCCAGCGTCT GATCGTCAAT
```

2601 AACATCGTCA CAATGGCGGC ACCAGGCGTA GAGCATCAGT ACGCTGCGCC  
2651 GGGTTTTTGC ATCAAATAAC TTTGAGGCTG TCGCAAACT TTTTCGAGCCA  
2701 ACTGCCATCG TTTTCGACCGC ATGATTGAGT AACGACGGAT TATTTCATATC  
2751 AGATCCTCCA GCATCAAACC TGCTGTCTGCT TTTGCCGAGC CGATGACGCC  
2801 AGGAATGCCT GCGCCGGGAT GCGTGCCTGC GCCGACCAGG TAGAGATTAG  
2851 TAATGGTTTT ATCGCGGTTA TGCGGCCGAA ACCAGGCGCT CTGGGTAAGA  
2901 ACGGGCTCCA CAGAAAAGGC TGAGCCATGA TAGGCATTAA GCTGGTTCGG  
2951 AAAATCAAAC GCGGTAAACA TCCGGTGCCT GACCAGCTGA CTCCGTAAGC  
3001 CAGGCATGTA ATGCTGCTCA AGGTACGCAA AAATACGGTC GCGTAGTTTT  
3051 GGCCCTCAA CCGTCCAGTC GAGGTTCCGG GTGCCTAAAT GCGGCACCGG  
3101 CGCCAACACA TAGTAACTGC CGCAACCTTC AGGCGCCAGT GACGAATCCG  
3151 TGACACAGGG CGCGTGCAGA TAAAGTGAGA AGTCCTCTGC GAGGCCATCA  
3201 TGATTAATAA TTTTCGTCAAT CAGCTCGCGG TAACGCGGGC CGAAAACAAC  
3251 CGTGTGATGC GCGAGCTGAT CATGATGGTG ATTCAAACCA AAATAGAGCA  
3301 CAAACAGAGA GTTACTCATG CGCTTAGTCT GCAGTTTGTT GGACTGCTTA  
3351 ACCGCGGCAG GGTGCTGGCT TAACAGGTCG CGATAGGTAT GAACCACATC  
3401 TGCATTTGAC GCGACGGCTT GCGTCAGGAA CCTGCGACCG TCCTCTAAAT  
3451 GCACGGCTTC AATCTTGTTT CCTGTCGTTT CCATATGGCT GACTCTGGCG  
3501 TTTAACACGA CTTCCGCCACC CAGATCCTGA AACAGCTTTA TCATCCCCTG  
3551 AACTAATGCG CCGGTGCCGC CACGCGGAAA CCAGACGCC CACTCACGCT  
3601 CCAGCGCGTG TATCAACGTA TAAATGGATG AGGTGGCGAA GGGATTGCCG  
3651 CCCACCAACA GCGAGTGAA AGAAAACGCC TGGCGCAGAT GTTCATCTTC  
3701 GATGTAACTG GCAACCTTAC TGTAACGCT TCTCCATGCC TGCAGTTTCG  
3751 CCAGTTGAGG TGCGGCGCGA AGCATGTCTC TGAACGATAA AAAAGGGACA  
3801 GTACCGAGCT TTAGATAGCC TTCTTTAAAC ACCGCGCGTG AATAGTCCAG  
3851 AAACCTGACGA TAACCTTCGA CATCGCGGGG ATTAAACTGC TGAATCTGCG  
3901 CTTCGAGCCG GGTTTGATCG TTATCGTAAT TAAAGACCTT CCCTGACTCC  
3951 CAACACAGGC GGTA AACCGG CGTAACCGGC AGCAGTTCGA CATACTCTTT  
4001 TAACTGTTTT CCTGCCAGTG CAAACAGTTC TTCAATGGCA CTGGGATCGG  
4051 TGATAACCGT CGGGCCTGCA TCAAAGGTAA ACCCCTGATC CTCGTAGACA  
4101 TAAGCCCGAC CGCCGGGTTT ATCACGTTGT TCAAGCAGTA AGACGGGGAT  
4151 CCCCAGAGCT TGTAGACGAA TTGCCAGTGC CAGGCCACCG AAGCCTGCAC  
4201 CAATTACCGT AGTTGGTTTC ATGTAGTCGC TCTTTAACGA TGAGTCGTCA  
4251 TAATGGCTTG CAATGCTGCT AATACCGGAA CAGGCGGCTT GCCGCTCAGA  
4301 ATACGTACCT AGGCTACGCT TGCTCTTTGC GGTGACTTG TAACACATCT  
4351 AAACCACTCT CATCCTTCGG AAACAAAGGA TATGCATACG CCTTGCCAA  
4401 CCGACTGCCA GAACCCCCAG CTGAAACCAG GTGAGCGAGC AACAACCCAC  
4451 GAAGTTCGTT GTTACCAATT GCGAACGTAG TGAGAGCAA CATGATCAAC  
4501 TCTGAGCTCG ACAATCTGTT ACCCAAAAAT CCTCTGCTCA GATTTGTTGG  
4551 AAGCGCAAAG AAGGTAATA AGAAGTTGCG CATCTGCTCG ATGCGAAGCG  
4601 ACATGAGAAG CTCCATACCG AACTGGTAGA AACCATTGTT TCTTCGTGGC  
4651 TCCGCACCCC AAAGGATTTT CCACGCTCTT CGGCTCGCCT CAATCTCGCC  
4701 ACCCTCCTTC AAGCCTTCGG CCATGGCCGT CGCAACACGC GGAGCTTTGC  
4751 TAATACTGTT TACGACGGAG TAGCCAGACG CAGGGTGGAC CATGCCGGCT  
4801 GCTGCACCGT ACGCGATGGT GCGTTGCGGG GCAACCGGCG GGGTACCGCC  
4851 CAGTGAATC CAACTCGCCT CGACTTCCAA GATGTCTTCT TCGACGATTT  
4901 CCATACCCAT CCGCTTCATA CGACGATACA ATCGCCGTTT GAGTTCATCG  
4951 AACGGCACTT GTACGCGCGC GACGAGGCAC GTCTCCTCGA CGAACACCAC  
5001 ATCCTTGTC ACGGGTAACA CGTAAAGGAA AGACGGCACG CGCCAAACGC  
5051 CCTCGTCTTG TTCTCTTTT ATCGCCTCCG GATCGCTTTG ACGAAAATCC  
5101 ATGAACACGG CCTTGTTTAC GGGAAAACCG TGGTTCCGAA TGCGCACCTC  
5151 AACGCCATAC GCAGTCTGCC AGCCCGGCGG CGCACCTCT TCGTAGCTGA  
5201 GCATGTGCGG GTTGTGACCG GTGCCGGCAA CGACGAGACG CGAATTCAAC  
5251 GTGAATTGCT GGCCTCTGTT TGCCTCTTCT TCGATCAACT TCTTCTCGCT  
5301 TGCGGTAATA TCGGAATCG TAATGATGGT GCCTCGAACT TCGGCTAACT  
5351 CGTTCTTTTC GACGTCACCG TGACGCACAA AATCTACCAG GCCTGGTAAA  
5401 TACTTGACGC CAGCCGCCGC GCACTCCTTC AACAAATGGT CGCGAAGACG  
5451 CCTGCGGCAC ACTTGACCGT AAGGTGACG GAGTTCAGTT CCACTCGCAG  
5501 GATCAGAATC ATCGAACCAA ACCAATGCGT CGTCATACTT ATGAAGCAAG

5551 CAGTGTTCGA GCCCTAGATC TTTGAACTCG TCGAGCCATA CTCCGTAGTT  
5601 GTTCACGAAC GGGGTGTCTG GTGCGACGAG ACCAACAGAA AGACCCTTCT  
5651 TCGCCGTCTC CGCTGCGATC GCCAGACCTG CGGGGCCCGC ACCGACAACG  
5701 AGAACGTCGA CCTTGTCGCG GTCGTTCAAA GCACTGAGGT ACTCTTTGAT  
5751 TTGCTTTTGC TCACTAAACA CCTTGCGCTG TTGAAACGCA ATCCATTCGC  
5801 GATCATCCTT CATCGTCTCC GGCTTCATGT CCTGCGGCTT GCTCAGTGTG  
5851 TCTTCGGCTA AGATCTTCTC AAAGTCTAAT GCGCTGCTTG TGATCGGTTT  
5901 CGCAGTGGGA TTTCCGACCG GGGCGGGAAT AGGCCCGTTT TCGACCGACT  
5951 TGAAGGCGTT GTTTTTGCCA TCTTCGAGGA TGAAACCGCC CCACTTGCTC  
6001 GAGTCAAAC TGTGTGTCGGC GAACGCAAAG TTTGCGAAGA ACGACCCCAT  
6051 GAAAGGCAGA GCGGATTTGA CAAAGTTAAC TCGCATGTAG TTCGAAAACA  
6101 ACGCGAACAG ATTCACCCCG AGCGAAAGCA AGCCCACCGG CTGGATTTCG  
6151 CAGCTCAAAA AGCCAGCCCA GACGTCTTG GGAAGGTCGA AGAAGGTGTC  
6201 AAAGAATTGA CGCGTCCAT CGATATCGAG CTGCATAAGA GTCTCCATTTC  
6251 CAAAGCACAT GAAAGTGCAG ATGCGCAAAT CATTCTCCGG CCAAATTGAG  
6301 TTCCACACTA ATGCCGCGGT GGCGTCGGCG TCGAATTTAC CGTTGTTTAT  
6351 TTGCGCCGCC TCCGCCGCTT CCAGGGCGCC GTAATATCC CCTCGCTTAC  
6401 CCGCCTTAAG GGCTTCATCA AGCGTGCCTA CGAGCGTTCT AACGCATAAC  
6451 ATCGTCTTTG CGACCATAAA TCCAGTGCTA GGATGGACCA TGCCGGCGGT  
6501 TCCACCGATG CCGAGCGTGC GTTGCAGAAA CGTCGGCAAC ACGCCGCCCA  
6551 TGGGAATGAG ACAATACTCC TCTTCGTGTA CCTTGGTTAC TTTACGCCCC  
6601 AAATAATCCA AACGCTCCTT CAACTTGAGC TTCAAGTCGT CAAACTCTAA  
6651 GCCAGGTCGT GCCACCAAGC TCGTTTCTC GAGGAACACC TCAGTTTCCG  
6701 AGAAAGGCAT GGCGTACAAA AACGTCCGCA ACCTGTCGTT CGCTCGCTTA  
6751 AACTCTGGGC TCAAGTGCTC GTCTCGCCAG TCCATGAACA GCATCGTGTC  
6801 CAACGAAAG TCGTGCTTCT CCACTGTGCA CACGATTCCG AAAGCGGCTT  
6851 GATATCCCGG CGTAAAATCG CGATCAAAGT CCACCAGCTT ACGAGAGTGC  
6901 CCAGTGGCGT CCAAAAACCAT CTTGCGCATAG ACCTTGCGTC CATCGCTCAA  
6951 AGTCACCACC GAATGGTTCG GATCGCTGTT ATCGCAGCTA TCGACCGCGG  
7001 CGATACCAA CTCCACGCCC TGCCTCACGC TGCCTCGGAT GAGCTTCTGC  
7051 TTGAGCTTCT TCCGATCCAC CTGCGCGTAC GCGCGGTGCA GCATCTTCCC  
7101 GTCGGCGTCT CCGTCTGCTA TAATAACTCG CGCCTTGTTT CACACCGCGC  
7151 GATAGCAATC ATCGAACCAG AGCGATTTAA ACTCGTCGCA CCACACCCCG  
7201 TAATTATTCA TCCACGGCGC GAGCGGCGAC GGATCCATCA ACGCCACGCG  
7251 CAATCCGCGC TTGCTCGCCT CGTCCGCGC CGTCAGCCCC GCCGGTCCGC  
7301 ACCCGACAAT CACCAAATCG TACGCCTCGC TCGCGCTCGT CCCCCATCGC  
7351 ACGTTCGGCA GCGTTTCTGG AAGCGGCGTT CGCGACTCCT CGCTCTCCCG  
7401 CCGATCGCCG CTCGTCAGCG GGTCCCACGA GCGTCCAAG CCGTACAGCT  
7451 CCGGCCGCGT CTCCCTCGCG CTCGGCCGTC GCGTCACCCG CGGCGTCGCC  
7501 GACGCCCCGC GCCGCGTCGC GCCCGGCGCG ACGTCGCGCG CGCGCGTTCC  
7551 CGCGTCGCCT ATTCCTAGGG CGATCGCCGC GAAATGGCTC ATGCAGCATC  
7601 CTTAACTGAC GGCAGCGAGT TTTTTGTCAA ACCAGGCCTG AATAAAAATGT  
7651 TGAGTGGCGT GCCCGTGTTG GCAGGCCGCA GAGAGATGCT CACTGGCAAG  
7701 CTGAAGATGT TGTCTCAGAC GTTCTTCAAC CGCCCTCGGG CCTAACAGAT  
7751 TGACCAGCGT CGATTTACCG GCGTCTGAT TGCTATCCTT ACCGGTGTGCG  
7801 GTCATGCCAT CGGTCAAATC GTCCAGCAGT TGAAATGCCT GACCAAGATC  
7851 AAGTGAAAA CGATGCAGGC AATCACGCGC TTCGCTGGAG GCATTCGCAA  
7901 CAATCGAGGC CATCTGCATG GAGGCACAAA ACAGCGTGCT GGTTTTAAAG  
7951 TGATTTCGTC TCAAAAATAG TTCAGCGCTG CGCGGCTTAT CCCCTTCAGA  
8001 CAGATCCTTG AACTGACCCT GAACCAATCC TTGCATGCCG ATGGCGTTTG  
8051 ACAGTTCAGA AACCGCCCGA TTTTTTGCCA GCGGCGTGAG GCCATCTGCA  
8101 TCGGCAATTA CGCCAAAGGC TTTACTCAGC AAGGCAACCG CCGCCAGTAT  
8151 TGCCACATGC TCTCCGTAAT GAGAATGAAT GGTAGGGCGT CCGCGCCGCA  
8201 GCTTCGCATC GTCCATGCAG GGCATATCGT CAAGGATCAG CGAAGCCGCG  
8251 TGGACCATTT CCACCGCACA GGCCAAATCC AGTAATCCGT CATGGCTGAC  
8301 AGCGCAACCC AGATCGCGGG CGGTGAGCAA CAGCAACATG GGGCGAATAC  
8351 GTTTTCCCGG TGCCAGCGCA CCTTCACGCA TCGCGGCACC CACAACATCC  
8401 CGTTCTCCCT CCACGGGCAA TAACTGATCA AGGCGTCGAT CAATATCAGC

8451 CAGTAACTGC TCCGCAGCAT CGCGAGTGAG ATGAACGTGT TTTTTTGCGC  
8501 AGACCGTCAT TCGGGCTGTC CTTATAAACG GATACATTTA CGGCAACGCG  
8551 AAAGATGCGG TGCCCTCAA AAAGACGCTT AATCTGCCAT AACATGGTTG  
8601 GCAGGCTTAC CCGTTATTTT ACATTTAGGG TTACAGGTTT TTTTTGCTAA  
8651 ATCCACATCG TTAATACTAG TTGAGCTTGT GGAAAAGGTG GAAAATTCAT  
8701 AAACCTCCGT CGGATTGGCA GACCGTGCGA TCGTCCATTC CGACAGCATC  
8751 GCCAGTCACT ATGGCGTGCT GCTAGCGCTA TATGCGTTGA TGCAATTTCT  
8801 ATGCGCACCC GTTCTCGGAG CACTGTCCGA CCGCTTTGGC CGCCGCCAG  
8851 TCCTGCTCGC TTCGCTACTT GGAGCCACTA TCGACTACGC GATCATGGCG  
8901 ACCACAGCCG TCCTGTGGAT CCTCTACGCC GGACGCATCG TGGCCGGCAT  
8951 CACCGCCGCG ACAGGTGCGG TTGCTGGCGC CTATATCGCC GACATCACCG  
9001 ATGGGGAAGA TCGGGCTCGC CACTTCGGGC TCATGAGCGC TTGTTTCGGC  
9051 GTGGGTATGG TGGCAGGCCG CACTGGCCGGG GGACTGTTGG GCGCCATCTC  
9101 CTGTCATGCA CCATTCCTTG CGGCGGCGGT GCTCAACGGC CTCAACCTAC  
9151 TACTGGGCTG CTTCCCTAATG CAGGAGTCGC ATAAGGGAGA GCGTCGACCG  
9201 ATGCCCTTGA GAGCCTTCAA CCCAGTCAGC TCCTTCCGGT GGGCGCGGGG  
9251 CATGACTATC GTCGCCGCAC TTATGACTGT CTTCTTTATC ATGCAACTCG  
9301 TAGGACAGGT GCCGGCAGCG CTCTGGGTCA TTTTCGGCGA GGACCCTTT  
9351 CGCTGGAGCG CGACGATGAT CGGCCTGTCG CTTGCGGTAT TCGGAATCTT  
9401 GCACGCCCTC GCTCAAGCCT TCGTCACTGG TCCCGCCACC AAACGTTTCG  
9451 GCGAGAAGCA GGCCATTATC GCCGGCATGG CGGCCGACGC GCTGGGCTAC  
9501 GTCTTGCTGG CGTTCGCGAC GCGAGGCTGG ATGGCCTTCC CCATTATGAT  
9551 TCTTCTCGCT TCCGGCGGCA TCGGGATGCC CGCGTTGCAG GCCATGCTGT  
9601 CCAGGCAGGT AGATGACGAC CATCAGGGAC AGCTTCAAGG ATCGCTCGCG  
9651 GCTCTTACCA GCCTAACTTC GATCACTGGA CCGCTGATCG TCACGGCGAT  
9701 TTATGCCGCC TCGGCGAGCA CATGGAACGG GTTGGCATGG ATTGTAGGCG  
9751 CCGCCCTATA CTTTGTCTGC CTCCCCGCGT TCGTTCGCGG TGCATGGAGC  
9801 CGGGCCACCT CGACCTGAAT GGAAGCCGGC GGCACCTCGC TAACGGATTTC  
9851 ACCACTCCAA GAATTGGAGC CAATCAATTC TTGCGGAGAA CTGTGAATGC  
9901 GCAAACCAAC CTTTGGCAGA ACATATCCAT CGCGTCCGCC ATCTCCAGCA  
9951 GCCGCACGCG GCGCATCTCG GGCAGCGTTG GGTCCCTGGCC ACGGGTGCGC  
10001 ATGATCGTGC TCCTGTCTGT GAGGACCCGG CTAGGCTGGC GGGGTTCCT  
10051 TACTGGTTAG CAGAATGAAT CACCGATACG CGAGCGAACG TGAAGCGACT  
10101 GCTGCTGCAA AACGTCTGCG ACCTGAGCAA CAACATGAAT GGTCTTCGGT  
10151 TTCCGTGTTT CGTAAAGTCT GGAAACGCGG AAGTCCCCTA CGTGCTGCTG  
10201 AAGTTGCCCG CAACAGAGAG TGAACCAAC CGGTGATACC ACGATACTAT  
10251 GACTGAGAGT CAACGCCATG AGCGGCCTCA TTTCTTATTC TGAGTTACAA  
10301 CAGTCCGCAC CGCTGTCCGG TAGCTCCTTC CGGTGGGCGC GGGGCATGAC  
10351 TATCGTCCGC GCACTTATGA CTGTCTTCTT TATCATGCAA CTCGTAGGAC  
10401 AGGTGCCCGC AGCGCCCAAC AGTCCCCCGG CCACGGGGCC TGCCACCATA  
10451 CCCACGCCGA AACAAGCGCC CTGCACCATT ATGTTCCGGA TCTGCATCGC  
10501 AGGATGCTGC TGGCTACCCT GTGGAACACC TACATCTGTA TTAACGAAGC  
10551 GCTAACCGTT TTTATCAGGC TCTGGGAGGC AGAATAAATG ATCATATCGT  
10601 CAATTATTAC CTCCACGGGG AGAGCCTGAG CAAACTGGCC TCAGGCATTT  
10651 GAGAAGCACA CGGTCACACT GCTTCCGGTA GTCAATAAAC CGGTAAACCA  
10701 GCAATAGACA TAAGCGGCTA TTTAACGACC CTGCCCTGAA CCGACGACCG  
10751 GGTCGAATTT GCTTTCGAAT TTCTGCCATT CATCCGCTTA TTATCACTTA  
10801 TTCAGGCGTA GCACCAGGCG TTTAAGGGCA CCAATAACTG CCTTAAAAAA  
10851 ATTACGCCCC GCCCTGCCAC TCATCGCAGT ACTGTTGTAA TTCATTAAGC  
10901 ATTCTGCCGA CATGGAAGCC ATCACAGACG GCATGATGAA CCTGAATCGC  
10951 CAGCGGCATC AGCACCTTGT CGCCTTGCGT ATAATATTTG CCCATGGTGA  
11001 AAACGGGGGC GAAGAAGTTG TCCATATTGG CCACGTTTAA ATCAAAACTG  
11051 GTGAAACTCA CCCAGGGATT GGCTGAGACG AAAAACATAT TCTCAATAAA  
11101 CCCTTTAGGG AAATAGGCCA GGTTTTCACC GTAACACGCC ACATCTTGCG  
11151 AATATATGTG TAGAAACTGC CGGAAATCGT CGTGGTATTC ACTCCAGAGC  
11201 GATGAAAACG TTTTCAGTTT CTCATGGAAA ACGGTGTAAC AAGGGTGAAC  
11251 ACTATCCCAT ATCACCAGCT CACCGTCTTT CATTGCCATA CG

**pBETA II**

1 GAATTCGGGA TGAGCATTCA TCAGGCGGGC AAGAATGTGA ATAAAGGCCG  
51 GATAAACTT GTGCTTATTT TTCTTTACGG TCTTTAAAAA GGCCGTAATA  
101 TCCAGCTGAA CGGTCTGGTT ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAAATGC  
151 CTCAAAATGT TCTTTACGAT GCCATTGGGA TATATCAACG GTGGTATATC  
201 CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCCT TAGCTCCTGA AAATCTCGAT  
251 AACTCAAAAA ATACGCCCCG TAGTGATCTT ATTTTCATTAT GGTGAAAAGTT  
301 GGAACCTCTT ACGTGCCGAT CAACGTCTCA TTTTCGCCAA AAGTTGGCCC  
351 AGGGCTTCCC GGTATCAACA GGGACACCAG GATTTATTTA TTCTGCGAAG  
401 TGATCTTCCG TCACAGGTAT TTATTCCGGC CAAAGTGCGT CGGGTGATGC  
451 TGCCAACTTA CTGATTTAGT GTATGATGGT GTTTTTGAGG TGCTCCAGTG  
501 GCTTCTGTTT CTATCAGCTG TCCCTCCTGT TCAGCTACTG ACGGGGTGGT  
551 GCGTAACGGC AAAAGCACCG CCGGACATCA GCGCTAGCGG AGTGTATACT  
601 GGCTTACTAT GTTGGCACTG ATGAGGGTGT CAGTGAAGTG CTTTATGTGG  
651 CAGGAGAAAA AAGGCTGCAC CGGTGCGTCA GCAGAATATG TGATACAGGA  
701 TATATTCCGC TTCTTCGCTC ACTGACTCGC TACGCTCGGT CGTTCGACTG  
751 CGGCGAGCGG AAATGGCTTA CGAACGGGGC GGAGATTTCC TGGAAGATGC  
801 CAGGAAGATA CTTAACAGGG AAGTGAGAGG GCCGCGGCAA AGCCGTTTTT  
851 CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACAAGCATCA CGAAATCTGA CGCTCAAATC  
901 AGTGGTGGCG AAACCCGACA GGAATAAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT  
951 GGCGGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTTCT GCCTTTTCGGT TTACCGGTGT  
1001 CATTCCGCTG TTATGGCCGC GTTTGTCTCA TTCCACGCCT GACACTCAGT  
1051 TCCGGGTAGG CAGTTCGCTC CAAGCTGGAC TGTATGCACG AACCCCCCGT  
1101 TCAGTCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC  
1151 CGGAAAGACA TGCAAAAAGCA CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAATTGATTT  
1201 AGAGGAGTTA GTCTTGAAGT CATGCGCCGG TTAAGGCTAA ACTGAAAGGA  
1251 CAAGTTTTGG TGACTGCGCT CCTCCAAGCC AGTTACCTCG GTTCAAAGAG  
1301 TTGGTAGCTC AGAGAACCTT CGAAAAACCG CCCTGCAAGG CGGTTTTTTC  
1351 GTTTTCAGAG CAAGAGATTA CGCGCAGACC AAAACGATCT CAAGAAGATC  
1401 ATCTTATTAA TCAGATAAAA TATTTCTAGA TTTTCAAGTCA ATTTATCTCT  
1451 TCAAATGTAG CACCTGAAGT CAGCCCCATA CGATATAAGT TGTAATTCTC  
1501 ATGTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG TTTATCACAG  
1551 TTAAATTGCT AACCGAGTCA GGCACCGTGT ATGAAATCTA ACAATGCGCT  
1601 CATCGTCATC CTCGGCACCG TCACCCTGGA TGCTGTAGGC ATAGGCTTGG  
1651 TTATGCCGGT ACTGCCGGGC CTCTTGCGGG ATCGAGCTCG TCTCTGTTAA  
1701 AATTGAATCC TTAAGCCTGC TGCCAGACGT TCACGCCGTC AGGGGCAAAG  
1751 AAGGTTGTGT TTCTTTTGGC TTCCTCTATG CGCCGCCCTT GTCAAAACTT  
1801 CAGGCGACGC TCCGGGAAAG ACATGGCGCT AGAGCGGGCG CTGCCAGAGA  
1851 TGCGCAGGGC GGGGAGGATG AGCCCGCATC CGGGAAGTAA GGGCCTGACC  
1901 AGAGGCGGCC AGCAGCAGCG TTAATTTTTTC GGGCGTGGTC GTTACTGACC  
1951 GCTGATCCCA GGCTTGCTGA CCGGCCTGTT CAACTTTGAC ACCTATTTTT  
2001 CGGTAAACCT GCTTCGCCGT AGCGATTGCC CAGGCGGAAC GCAGGGGCAA  
2051 CCCTGCCAGG CCGGCTGTGG CAGACAAATA GTAAGGTTCT GCTTCCTGCA  
2101 CCAAACGACG GGCGATACGG CTCAGCGCCT GACGGTTTTT AGGTGCCGCA  
2151 TAATTCTCTT TGTTTACAGC TTCATGCTCC AGCCAGCTTG CCGGCAGATA  
2201 ACAGCGGCCG GCATGCGCAT CGTCCACAAT ATCGCGAGCA ATATTGGTCA  
2251 ACTGAAATGC CAGCCCAAGG TCACAGGCGC GGTCCAGCGT GGCGTTATCC  
2301 CGCACGCCCA TGATTTGCGC CATCATCAAG CCGACAACGC CTGCAACGTG  
2351 ATAGCAATAG CGCAGCGTAT CATCCAGTTG GCTGTATTGC GCTTCGCGTA  
2401 CATCCATGGC GAAGCCTTCC AGATGATCAA ACGCGTAAGC CGGGGCGATA  
2451 TCATGAGCCA TAGCCACTTC CTGAAAAGCC GCAAACGCCG GTTCGTGCAT  
2501 CTGCGATCCT GCATAGGCCT GGCAGCTTTT CATCTCAAGT TGCATCAGAC  
2551 GTTGTTCGGG CGTTTGTAAG GCAGGCTGCC GGGCCTGAAA GCCCAGCGTC  
2601 TGATCGTCAA TAACATCGTC ACAATGGCGG CACCAGGCGT AGAGCATCAG  
2651 TACGCTGCGC CGGGTTTTTG CATCAAATAA CTTTGAGGCT GTCGCAAAAC  
2701 TTTTCGAGCC AACTGCCATC GTTTCGACCG CATGATTGAG TAACGACGGA  
2751 TTATTCATAT CAGATCCTCC AGCATCAAAC CTGCTGTCCG TTTTGCCGAG

2801 CCGATGACGC CAGGAATGCC TGCGCCGGGA TCGTGCCTG CGCCGACCAG  
2851 GTAGAGATTA GTAATGGTTT TATCGCGGTT ATGCGGCCGA AACCAGGCGC  
2901 TCTGGGTAAG AACGGGCTCC ACAGAAAAGG CTGAGCCATG ATAGGCATTA  
2951 AGCTGGTCGC GAAAATCAAA CGGCGTAAAC ATCCGGTGCG TGACCAGCTG  
3001 ACTCCGTAAG CCAGGCATGT AATGCTGCTC AAGGTACGCA AAAATACGGT  
3051 CGCGTAGTTT TGGCCCCTCA ACCGTCCAGT CGAGGTTCCG GGTGCCTAAA  
3101 TGCGGCACCG GCGCCAACAC ATAGTAACTG CCGCAACCTT CAGGCGCCAG  
3151 TGACGAATCC GTGACACAGG GCGCGTGCAG ATAAAGTGAG AAGTCCTCTG  
3201 CGAGGCCATC ATGATTAATA ATTTCTGTCG TCAGCTCGCG GTAACGCGGG  
3251 CCGAAACAAA CCGTGTGATG CCGGAGCTGA TCATGATGGT GATTCAAACC  
3301 AAAATAGAGC ACAAACAGAG AGTTACTCAT GCGCTTAGTC TGCAGTTTGT  
3351 TGGACTGCTT AACCGCGGCA GGGTGTGCTG TTAACAGGTC GCGATAGGTA  
3401 TGAACCACAT CTGCATTTGA CCGGACGGCT TCGTTCAGGA ACCTGCGACC  
3451 GTCTCTATAA TGCACGGCTT CAATCTTGTT TCCTGTCTGTT TCCATATGGC  
3501 TGACTCTGGC GTTTAACACG ACTTCGCCAC CCAGATCCTG AAACAGCTTT  
3551 ATCATCCCTT GAACTAATGC GCCGGTGCCG CCACGCGGAA ACCAGACGCC  
3601 CCACTCACGC TCCAGCGCGT GTATCAACGT ATAAATGGAT GAGGTGGCGA  
3651 AGGGATTGCC GCCCACCAAC AGCGAGTGGA AAGAAAACGC CTGGCGCAGA  
3701 TGTTTCATCTT CGATGTAACT GGCAACCTTA CTGTAAACGC TTCTCCATGC  
3751 CTGCAGTTTC GCCAGTTGAG GTGCGGCGCG AAGCATGTCT CTGAACGATA  
3801 AAAAAGGGAC AGTACCGAGC TTTAGATAGC CTTCTTTAAA CACCGCGCGT  
3851 GAATAGTCCA GAAACTGACG ATAACCTTCG ACATCGCGGG GATTAAACTG  
3901 CTGAATCTGC GCTTCGAGCC GGGTTTGATC GTTATCGTAA TTAAAGACCT  
3951 TCCCTGACTC CCAACACAGG CGGTAAAACG GCGTAACCGG CAGCAGTTCC  
4001 ACATACTCTT TTAACTGTTT TCCTGCCAGT GCAAACAGTT CTTCAATGGC  
4051 ACTGGGATCG GTGATAACCG TCGGGCCTGC ATCAAAGGTA AACCCCTGAT  
4101 CCTCGTAGAC ATAAGCCCGA CCGCCGGGTT TATCACGTTG TTCAAGCAGT  
4151 AAGACGGGGA TCCCCGCAGC TTGTAGACGA ATTGCCAGTG CCAGGCCACC  
4201 GAAGCCTGCA CCAATTACCG TAGTTGGTTT CATGTAGTCG CTCTTTAACG  
4251 ATGAGTCGTC ATAATGGCTT GCAATGCTGC TAATACCGGA ACAGGCGGCT  
4301 TGCCGCTCAG AATACGTAGC CGATCGGTCA GCGTGAGTTT TCCCGCATAA  
4351 AAACGGGCAA TTAATCTTC AGGTAAACCA TAAAAACGCT GCATAACCCG  
4401 CCAGCGTGAA TCGGCGGGTC CGGCTAAAAA CAGCATGCGA TTCAGCATGC  
4451 GGAAAAAGCC CTGCTGCTGC CAGCGCTCGC GGGCAAAATG CGTAATGGCA  
4501 TGGTGAATTG AGGCCGACGT AAAGACATCA AGTGCCTCA GCGGGTCGGC  
4551 CACGGCAACC GCCAGCGGCA GTGAATAGCC GGTGGTAGGA TGGAACAGAC  
4601 CGGCACGTAA TCCACTACAG GCCAGGGGGC GCTGCTGCCA GAATGCGTCG  
4651 GCATTGCCCG ACAGAGTAAT GGGTAAGGCG CCCTGTTCTT CTCGCAGCAG  
4701 TGTCTGAAGC TGCCAACCTT GTTGC GCGGC ATAGTCGCAA ATATTTTGCC  
4751 GCGCGCATTG AGGATCTAAT GTCGCATTAT CAATATAGTG CGTGTCTTCA  
4801 ATTAACAATC TGGTCGGCGA GAGCGGCAGG CTGTACACGA AGCGATAACC  
4851 ATTTTGCTGA TCGACCGTGG CATCCATGAT AATGGGAGAC GATAAACCAT  
4901 GCGGGTGGCT CAATCGCCAT TCCTGGCCAA TAAACGCCTG GAAGCCCACG  
4951 CTCAGTGCTG AATTTGCCGC ATAACCCCGC CCGTCAATCA CCGCGCGGGC  
5001 ACCGATAACC TGACCCTTTT TCAACCGAAC AGATTCCGCA TTAACCTCTG  
5051 CGACCGCGGT ATCCATCCAC AAGTGC GGGC CAAACTGTCTG CTGTAAAACC  
5101 TCAGCGAAAC GCTGAGAAGT AATACAAAAG TAGCCGCTGT TCAGCTTACG  
5151 ACGGCGTGTG GGAAAGCGTA CCTGATAGTC GGGCCAGTGA TGAACCACCA  
5201 GCGGAGCTAT CCAACGATGT TGGCTCTCAG TCAAATCATC GTGGTGAAT  
5251 GACCACGTAT GATTCCCGCC CGCCTGGGGT GCGGCGTCGA TAAGCAAAAT  
5301 ACGCATATCA GGTGCTGCT GCTGAAGACG CAGGGCGATA AGGCCATTCG  
5351 CGAGTCCAGC CCCCACGAGA ATCAGATCAT AATGCGGTTG CATAGCCGCT  
5401 CCCACTTAAG ACAGGCTGAC CGGTGCACAT AACCTGCTCA ATGATATCGG  
5451 CAGCGGCCAT GGTGCCCCCT GCCAAACGAA GGGCTGTCTG GATTTTCGCC  
5501 ATGCGCTGCT GAAAGTCGAC GTTGGTCAGC AATGAACGCA TCTGACGAGC  
5551 CAAAGCATGG CTGGTGGTAA AGCGGGAAGC ACGCTTGCCG ATGCCGTGAT  
5601 AAACGATGCG TGACGCGACG CCGGGCTGAT CAAAGGCCAG CGGAAGCGCT  
5651 AAAAGGGGCG TCCGGTAATT AATCGCGTCC AGTACCGTAT TCATGCCGCC  
5701 GTGGGTGATC GCCAGCTGCG CCTGAGACAG CCGGGCTGAC TGATCGGCAA

5751 AATCCACCAC CTGTGTATGA CGGCTTCGCG CCAGCTCTTC AACTGAGAG  
5801 TCCGTAAGAC GACCACAGTG GGCTAACAGG AGCTGACCGT CAATTTCTTC  
5851 ACAGGCTTTC ACTATCGTTT TAAACAGCCC ATAACGGTGT CCCTGAAGCG  
5901 TGCCAGCGA GCGGAAAATC CGGGGTTTTT CTGAGGATGT AAAATAACGG  
5951 GATGAAGACG TTGACGGTGC GTGCGTTTTG CGCAGAGGCC CGACGGCATG  
6001 AAAACAAGCC GGTAACGCTT TGCGGGAAA ATCCAGTTCA GGAACAAGCT  
6051 GGCTGATTTG CGCCAGTGGC GAAAAACACT GGTGAAGCTT TTGCCGGGG  
6101 GCTAAGCCCA TTCTGTGGCT GTGTTTCGGCA ATGACACGGT CATGACGACG  
6151 CATTAGCCAG TCATAAATTT TTTCACTGGC GGCATAACGT TCGCGAGCCG  
6201 CGTCGCTGGT CCCGTATTCG AAAGGCATAA CCGCCAGGGG CATATCCGGT  
6251 TCACGATTGA GAGGCAGCGC GCAGGCACA GAGATAAACG GCAGTCCCAG  
6301 TGCTTCAGCA ACGAGCGCGC CTGCCGGTTC CATTTGATCA ACAATGACGC  
6351 CATCGACGGC CAGATCGTTA AATGCCTGGG GGAGTTCGCG GCACGCATA  
6401 TCGGTGGTGC GCGCCATTTT ATTGATGAGC TTCAGCATTG ACGGCCCCAG  
6451 AGGATGAGCC GCCAGGTGTA GCACGCGCGT TAACGCGCCG GGGGGATGGC  
6501 TGTCTGTCCC GACGGAATGA AATCCAATGG TTTCGCTATC GATCAAGTGT  
6551 TTAATATCGT ATTGCTGAAT AAAGTCACCC GATGACCGCG CGCGACCAGT  
6601 TCCTGAGCGA GATTCTGTAA TGCGCGAACA TGGCTGTAAA AAGGCGGTGC  
6651 GATCGCCGCG AAATGGCTCA TGCAGCATCC TTAAGTACG GCAGCGAGTT  
6701 TTTTGTCAA CCAGGCCTGA ATAAAATGTT GAGTGGCGTG CCCGTGTTGG  
6751 CAGGCCGAG AGAGATGCTC ACTGGCAAGC TGAAGATGTT GTCTCAGACG  
6801 TTCTTCAACC GCCCTCGGGC CTAACAGATT GACCAGCGTC GATTTACCGG  
6851 CGTCCTGATT GCTATCCTTA CCGGTGTGCG TCATGCCATC GGTCAAATCG  
6901 TCCAGCAGTT GAAATGCCGT ACCAAGATCA AGTGAAAAAC GATGCAGGCA  
6951 ATCACGCGCT TCGCTGGAGG CATTGCAAC AATCGAGGCC ATCTGCATGG  
7001 AGGCACAAA CAGCGTGCTG GTTTTAAAGT GATTCGTCAT CAAAATAGCT  
7051 TCAGCGCTGC GCGGCTTATC CCCTTCAGAC AGATCCTTGA ACTGACCCTG  
7101 AACCAATCCT TGCATGCCGA TGGCGTTTGA CAGTTCAGAA ACCGCCCGAT  
7151 TTTTGGCCAG CGGCGTGAGG CCATCTGCAT CGGCAATTAC GCCAAAGGCT  
7201 TTAAGTCAAG AGGCAACCGC CGCCAGTATT GCCACATGCT CTCCGTAATG  
7251 AGAATGAATG GTAGGGCGTC CGCGCCGAG CTTCGCATCG TCCATGCAGG  
7301 GCATATCGTC AAGGATCAGC GAAGCCGCGT GGACCATTTT CACCGCACAG  
7351 GCCAAATCCA GTAATCCGTC ATGGCTGACA GCGCAACCCA GATCGCGGGC  
7401 GGTCAGCAAC AGCAACATGG GGCGAATACG TTTTCCCGGT GCCAGCGCAC  
7451 CTTCACGCAT CGCGGCACCC ACAACATCCC GTTCTCCCTC CACGGGCAAT  
7501 AACTGATCAA GCGTTCGATC AATATCAGCC AGTAACTGCT CCGCAGCATC  
7551 GCGAGTGAGA TGAACGTGTT TTTTTCGCA GACCGTCATT CGGGCTGTCC  
7601 TTATAACCGG ATACATTTAC GGCAACGCGA AAGATGCGGT GCCCTTCAA  
7651 AAGACGCTTA ATCTGCCATA ACATGGTTGG CAGGCTTACC CGTTATTTTA  
7701 CATTTAGGGT TACAGGTTTT TTTTGTAAA TCCACATCGT TAATACTAGT  
7751 TGAGCTTGTT GAAAAGGTGG AAAATTCATA AACCTCCGTC GGATTGGCAG  
7801 ACCGTGCGAT CGTCCATTCC GACAGCATCG CCAGTACTA TGGCGTGCTG  
7851 CTAGCGCTAT ATGCGTTGAT GCAATTTCTA TGCGCACCCG TTCTCGGAGC  
7901 ACTGTCCGAC CGCTTTGGCC GCCGCCAGT CCTGCTCGCT TCGCTACTTG  
7951 GAGCCACTAT CGACTACGCG ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC  
8001 CTCTACGCCG GACGCATCGT GGCCGGCATC ACCGGCGCCA CAGGTGCGGT  
8051 TGCTGGCGCC TATATCGCCG ACATCACCGA TGGGGAAGAT CGGGCTCGCC  
8101 ACTTCGGGCT CATGAGCGCT TGTTCGGCG TGGGTATGGT GGCAGGCCCC  
8151 GTGGCCGGGG GACTGTTGGG CGCCATCTCC TTGCATGCAC CATTCTTGC  
8201 GGCGGCGGTG CTCAACGGCC TCAACCTACT ACTGGGCTGC TTCCTAATGC  
8251 AGGAGTCGCA TAAGGGAGAG CGTCGACCGA TGCCCTTGAG AGCCTTCAAC  
8301 CCAGTCAGCT CCTTCCGGTG GCGCGGGGGC ATGACTATCG TCGCCGCACT  
8351 TATGACTGTC TTCTTTATCA TGCAACTCGT AGGACAGGTG CCGGCAGCGC  
8401 TCTGGGTCAT TTTGCGGAG GACCGCTTTC GCTGGAGCGC GACGATGATC  
8451 GGCCTGTCGC TTGCGGTATT CGGAATCTTG CACGCCCTCG CTCAAGCCTT  
8501 CGTCACTGGT CCCGCCACCA AACGTTTCGG CGAGAAGCAG GCCATTATCG  
8551 CCGCATGGC GGCCGACGCG CTGGGCTACG TCTTGCTGGC GTTCGCGACG  
8601 CGAGGCTGGA TGGCCTTCCC CATTATGATT CTTCTCGCTT CCGGCGGCAT

8651 CGGGATGCCC GCGTTGCAGG CCATGCTGTC CAGGCAGGTA GATGACGACC  
 8701 ATCAGGGACA GCTTCAAGGA TCGCTCGCGG CTCTTACCAG CCTAACTTCG  
 8751 ATCACTGGAC CGCTGATCGT CACGGCGATT TATGCCGCCT CGGCGAGCAC  
 8801 ATGGAACGGG TTGGCATGGA TTGTAGGCGC CGCCCTATAC CTTGTCTGCC  
 8851 TCCCCGCGTT GCGTCGCGGT GCATGGAGCC GGGCCACCTC GACCTGAATG  
 8901 GAAGCCGGCG GCACCTCGCT AACGGATTCA CCACTCCAAG AATTGGAGCC  
 8951 AATCAATTCT TCGGAGAAC TGTGAATGCG CAAACCAACC CTTGGCAGAA  
 9001 CATATCCATC GCGTCCGCCA TCTCCAGCAG CCGCACGCGG CGCATCTCGG  
 9051 GCAGCGTTGG GTCCCTGGCCA CGGGTGCGCA TGATCGTGCT CCTGTCTGTTG  
 9101 AGGACCCGGC TAGGCTGGCG GGGTTGCCTT ACTGGTTAGC AGAATGAATC  
 9151 ACCGATACGC GAGCGAACGT GAAGCGACTG CTGCTGCAA ACCTCTGCGA  
 9201 CCTGAGCAAC AACATGAATG GTCTTCGGTT TCCGTGTTTC GTAAAGTCTG  
 9251 GAAACGCGGA AGTCCCCTAC GTCTGCTGA AGTTGCCCGC AACAGAGAGT  
 9301 GGAACCAACC GGTGATACCA CGATACTATG ACTGAGAGTC AACGCCATGA  
 9351 GCGGCCTCAT TTCTTATTCT GAGTTACAAC AGTCCGCACC GCTGTCCGGT  
 9401 AGCTCCTTCC TAGGCTGGCG GGGCATGACT ATCGTCGCCG CACTTATGAC  
 9451 TGTCTTCTTT ATCATGCAAC TCGTAGGACA GTTGCCGGCA GCGCCCAACA  
 9501 GTCCCCCGGC CACGGGGCCT GCCACCATAC CCACGCCGAA ACAAGCGCCC  
 9551 TGCACCATTA TGTTCCGGAT CTGCATCGCA GGATGCTGCT GGCTACCCTG  
 9601 TGGAACACCT ACATCTGTAT TAACGAAGCG CTAACCGTTT TTATCAGGCT  
 9651 CTGGGAGGCA GAATAAATGA TCATATCGTC AATTATTACC TCCACGGGGA  
 9701 GAGCCTGAGC AAAGTGGCCT CAGGCATTTG AGAAGCACAC GGTCACACTG  
 9751 CTCCCGGTAG TCAATAAACC GGTAAACCAG CAATAGACAT AAGCGGCTAT  
 9801 TTAACGACCC TGCCCTGAAC CGACGACCGG GTCGAATTTG CTTTCGAATT  
 9851 TCTGCCATT C ATCCGCTTAT TATCACTTAT TCAGGCGTAG CACCAGGCGT  
 9901 TTAAGGGCAC CAATAACTGC CTTAAAAAAA TTACGCCCCG CCCTGCCACT  
 9951 CATCGCAGTA CTGTTGTAAT TCATTAAGCA TTCTGCCGAC ATGGAAGCCA  
 10001 TCACAGACGG CATGATGAAC CTGAATCGCC AGCGGCATCA GCACCTTGTC  
 10051 GCCTTGCGTA TAATATTTGC CCATGGTGAA AACGGGGGCG AAGAAGTTGT  
 10101 CCATATTGGC CACGTTTAAA TCAAACTGG TGAAACTCAC CCAGGGATTG  
 10151 GCTGAGACGA AAAACATATT CTCAATAAAC CCTTTAGGGA AATAGGCCAG  
 10201 GTTTTCACCG TAACACGCCA CATCTTGCGA ATATATGTGT AGAAACTGCC  
 10251 GGAAATCGTC GTGGTATTCA CTCCAGAGCG ATGAAAACGT TTCAGTTTGC  
 10301 TCATGGAAAA CGGTGTAACA AGGGTGAACA CTATCCATA TCACCAGCTC  
 10351 ACCGTCTTTC ATTGCCATAC G

**pCANTHA**

1 GAAATCTAAC AATGCGCTCA TCGTCATCCT CGGCACCGTC ACCCTGGATG  
 51 CTGTAGGCAT AGGCTTGTTT ATGCCGGTAC TGCCGGGCCT CTTGCGGGAT  
 101 CGAGCTCGTC TCTGTTAAAA TTGAATCCTT AAGCCTGCTG CCAGACGTCCT  
 151 CTACCGGAGA AATTATGCCG CGCGAGGATT CTGACAAGCG CACGCTGCGC  
 201 GAGCGCGTTC ACCTGTACCG CCCGCCGCGT TCAGACCTAG GTGGCATTGC  
 251 GGTCGCTGTG ACAGTCATCG CGCTGTGGGC GACGCTGTTT GTCTACGGGC  
 301 TGTGGTTCGT CAAGCTGCCA TGGGCGCTCA AAGTGGGCGA GACAGCCACG  
 351 TCCTGGGCAA CCATTGCTGC TGTATTCTTT AGCCTGGAAT TCCTTTACAC  
 401 CGGGCTCTTC ATCACCACGC ACGACGCGAT GCATGGCACC ATCGCGCTGC  
 451 GCAACCGGCG CCTGAACGAC TTTCTGGGCC AGCTGGCAAT CAGCCTATAC  
 501 GCCTGGTTTG ACTACTCCGT CCTGCACCGC AAGCACTGGG AGCACCACAA  
 551 CCACACCGGG GAGCCGCGTG TGGATCCGGA CTTCCACCGC GGCAACCCCA  
 601 ACCTGGCGGT GTGGTTCGCG CAGTTCATGG TGTCGTACAT GACCCTCAGC  
 651 CAGTTCCTCA AGATCGCGGT CTGGTCCAAC CTGCTGCTGC TGGCGGGTGC  
 701 GCCGCTGGCC AACCAGCTGC TGTTCATGAC GCGGGCGCCC ATCCTGTCCG  
 751 CCTTCCGCCT GTTCTACTAC GGCACCTACG TGCCGCACCA CCCGGAGAAG  
 801 GGGCACACCG GCGCCATGCC CTGGCAGGTA TCCCGCACCA GCTCCGCCTC  
 851 CCGGCTGCAG TCGTTCCTCA CCTGCTACCA CTTGACCTG CACTGGGAGC  
 901 ACCACCGCTG GCCCTACGCG CCCTGGTGGG AGCTGCCCAA GTGCCGCCAG  
 951 ATTGCCCGCG GCGCAGCCCT GCGCGCCGGG CCGCTGCCCG TGCCGGCAGC



1001 GGC GGCGGCT ACAGCCGCCA CCGCGGCGGC GGCAGCAGCA GCTACAGGCA  
1051 GCCCCGCTCC CGCCAGCCGA GCAGGGTCAG CTTCCCTCCG CTCCGCAGCG  
1101 GCCTCCGGAT TTGGATCCGG ACACAGCGGC TCTGTGGCTG CGCAGCCGCT  
1151 GTCTTCGCTG CCCTTGCTGA GCGAGGGCGT GAAGGGGTTG GTGGAGGGGG  
1201 CGATGGAGTT GGTGGCAGGT GGCAGCAGCA GCGGCGGTGG TGGAGAGGGC  
1251 GGCAAGCCGG GCGCGGGGGA GCACGGGCTG CTGCAGCGGC AGCGGCAGCT  
1301 GCGCCTGTT GCGGTGATGG CTTGACCTGC ATCACGCCGT CAGGGGCAAA  
1351 GAAGGTTGTG TTTCTTTTGG CTTCTCTAT GCGCCGCCCC TGTCAAAACCT  
1401 TCAGGCGACG CTCCGGGAAA GACATGGCGC TAGAGCGGGC GCTGCCAGAG  
1451 ATGCGCAGGG CGGGGAGGAT GAGCCCGCAT CCGGGAAGTA AGGGCCTGAC  
1501 CAGAGCGCGC CAGCAGCAGC GTTAATTTTT CGGGCGTGGT CGTTGACTGC  
1551 CGTGATCCC AGGCTTGCTG ACCGGCCTGT TCAACTTTGA CACCTATTTT  
1601 CCGGTAAACC TGGTTCGCCG TAGCGATTGC CCAGGCGGAA CGCAGGGCA  
1651 ACCCTGCCAG GCCGGCTGTG GCAGACAAAT AGTAAGGTTT TGCTTCTGTC  
1701 ACCAAACGAC GCGCGATACG GCTCAGCGCC TGACGGTTTT CAGGTGCCGC  
1751 ATAATTCTCT TTGTTTCAGAC CTTTCATGCTC CAGCCAGCTT GCCGGCAGAT  
1801 AACAGCGGCC CGCATGCGCA TCGTCCACAA TATCGCGAGC AATATTGGTC  
1851 AACTGAAATG CCAGCCCAAG GTCACAGGCG CGGTCCAGCG TGGCGTTATC  
1901 CCGCACGCC ATGATTTGCG CCATCATCAA GCCGACAACG CCTGCAACGT  
1951 GATAGCAATA GCGCAGCGTA TCATCCAGTT GGCTGTATTG CGCTTCGCGT  
2001 ACATCCATGG CGAAGCCTTC CAGATGATCA AACCGGTAAG CCGGGGCGAT  
2051 ATCATGAGCC ATAGCCACTT CCTGAAAAGC CGCAAACGCC GGTTTCGTGCA  
2101 TCTGCGATCC TGCATAGGCC TGGCGCGTTT TCATCTCAAG TTGCATCAGA  
2151 CGTTGTTCCG GCGTTTGTA GGCAGGCTGC CGGGCCTGAA AGCCCAGCGT  
2201 CTGATCGTCA ATAACATCGT CACAATGGCG GCACCAGGCG TAGAGCATCA  
2251 GTACGCTGCG CCGGGTTTTT GCATCAAATA ACTTTGAGGC TGTCGCAAAA  
2301 CTTTTGAGC CAACTGCCAT CGTTTTGACC GCATGATTGA GTAACGACGG  
2351 ATTATTCATA TCAGATCCTC CAGCATCAAA CCTGCTGTGCG CTTTTGCCGA  
2401 GCCGATGACG CCAGGAATGC CTGCGCCGGG ATGCGTGCCT GCGCCGACCA  
2451 GGTAAGATT AGTAATGGTT TTATCGCGGT TATGCGGCCG AAACCAGGCG  
2501 CTCTGGGTAA GAACGGGCTC CACAGAAAAG GCTGAGCCAT GATAGGCATT  
2551 AAGCTGGTCG CGAAAATCAA ACGGCGTAAA CATCCGGTGC GTGACCAGCT  
2601 GACTCCGTAA GCCAGGCATG TAATGCTGCT CAAGGTACGC AAAAAACGG  
2651 TCGCGTAGTT TTGGCCCTC AACCGTCCAG TCGAGGTTGCG CGGTGCCATA  
2701 ATGCGGCACC GCGGCCAACA CATAGTAACT GCCGCAACCT TCAGGCGCCA  
2751 GTGACGAATC CGTGACACAG GCGCGGTGCA GATAAAGTGA GAAGTCTCT  
2801 GCGAGGCCAT CATGATTA AATTTGCTCA ATCAGCTCGC GGTAACGCGG  
2851 GCCGAAACAA ACCGTGTGAT GCGCGAGCTG ATCATGATGG TGATTCAAAC  
2901 CAAAATAGAG CACAAACAGA GAGTTACTCA TCGGCTTAGT CTGCAGTTT  
2951 TTGGACTGCT TAACCGCGGC AGGGTGCTGG CTTAACAGGT CGCGATAGGT  
3001 ATGAACCACA TCTGCATTTG ACGCGACGGC TTGCGTCAGG AACCTGCGAC  
3051 CGTCTCTAA ATGCACGGCT TCAATCTTGT TTCTGTGCTG TTCCATATGG  
3101 CTGACTCTGG CGTTTAAACAC GACTTCGCCA CCCAGATCCT GAAACAGCTT  
3151 TATCATCCCC TGAACATAAT GCGCCGGTGCC GCCACGCGGA AACCAGACGC  
3201 CCCACTCACG CTCCAGCGCG TGTATCAACG TATAAATGGA TGAGGTGGCG  
3251 AAGGGATTGC CGCCACCAA CAGCGAGTGG AAAGAAAACG CCTGGCGCAG  
3301 ATGTTTCATCT TCGATGTAAC TGGCAACCTT ACTGTAAACG CTTCTCCATG  
3351 CCTGCAGTTT CGCCAGTTGA GGTGCGGCGC GAAGCATGTC TCTGAACGAT  
3401 AAAAAAGGGA CAGTACCGAG CTTTAGATAG CCTTCTTTAA ACACCGCGCG  
3451 TGAATAGTCC AGAAACTGAC GATAACCTTC GACATCGCGG GGATTAAACT  
3501 GCTGAATCTG CGCTTCGAGC CGGGTTTGAT CGTTATCGTA ATTAAGACC  
3551 TTCCCTGACT CCAACACAG GCGGTAAAAC GCGTAACCG GCAGCAGTTC  
3601 GACATACTCT TTTAACTGTT TTCCTGCCAG TGCAAACAGT TCTTCAATGG  
3651 CACTGGGATC GGTGATAACC GTCGGGCTG CATCAAAGGT AAACCCCTGA  
3701 TCCTCGTAGA CATAAGCCCC ACCGCCGGT TTATCACGTT GTTCAAGCAG  
3751 TAAGACGGGG ATCCCCGAG CTTGTAGACG AATTGCCAGT GCCAGGCCAC  
3801 CGAAGCCTGC ACCAATTACC GTAGTTGGTT TCATGTAGTC GCTCTTTAAC  
3851 GATGAGTCGT CATAATGGCT TGCAATGCTG CTAATACCGG AACAGGCGG

3901 TTGCCGCTCA GAATACGTAG CCGATCGGTC AGCGTGAGTT TTCCCGCATA  
3951 AAAACGGGCA ATTAAATCTT CAGGTAAACC ATAAAAACGC TGCATAACCC  
4001 GCCAGCGTGA ATCGGCGGGT CCGGCTAAAA ACAGCATGCG ATTCAGCATG  
4051 CGGAAAAAGC CCTGCTGCTG CCAGCGCTCG CGGGCAAAT GCGTAATGGC  
4101 ATGGTGAATT GAGGCCGACG TAAAGACATC AAGTGCACCTC AGGCGGTCCG  
4151 CCACGGCAAC CGCCAGCGGC AGTGAATAGC CCGTGGTAGG ATGGAACAGA  
4201 CCGGCACGTA ATCCACTACA GGCCAGGGGG CGCTGCTGCC AGAATGCGTC  
4251 GGCATTGCCC GACAGAGTAA TGGGTAAGGC GCCCTGTTCT TCTCGCAGCA  
4301 GTGTCTGAAG CTGCCAACCC TGTTCGCGCG CATAGTCGCA AATATTTTGC  
4351 CGCGCGCATT CAGGATCTAA TGTCGCATTA TCAATATAGT GCGTGTCTTC  
4401 AATTAACAAT CTGGTCGGCG AGAGCGGCAG GCTGTACACG AAGCGATAAC  
4451 CATTTTGTGT ATCGACCGTG GCATCCATGA TAATGGGAGA CGATAAACCA  
4501 TGCGGGTGGC TCAATCGCCA TTCCTGGCCA ATAAACGCCT GGAAGCCAC  
4551 GCTCAGTGCT GAATTTGCCG CATAACCCCG CCCGTCAATC ACCGCGCCGG  
4601 CACCGATAAC CTGACCCCTT TTCAACCGAA CAGATTCCGC ATTAACCTCT  
4651 GCGACCGCGG TATCCATCCA CAAGTGCGGG CCAAACGTGC GCTGTAAAAC  
4701 CTCAGCGAAA CGCTGAGAAG TAATACAAAA GTAGCCGCTG TTCAGCTTAC  
4751 GACGGCGTGT GGGAAAGCGT ACCTGATAGT CGGGCCAGTG ATGAACCACC  
4801 AGCGGAGCTA TCCAACGATG TTGGCTCTCA GTCAAATCAT CGTGGTGAAA  
4851 TGACCACGTA TGATTCCCGC CCGCCTGGGG TGCGGCGTCG ATAAGCAAAA  
4901 TACGCATATC AGGTTGCTGC TGCTGAAGAC GCAGGGCGAT AAGGCCATTTC  
4951 GCGAGTCCAG CCCCCACGAG AATCAGATCA TAATGCGGTT GCATAGCCGC  
5001 TCCCACCTAA GACAGGCTGA CCGGTGCACA TAACCTGCTC AATGATATCG  
5051 GCAGCGGCCA TGGTGCCCC TGCCAAACGA AGGGCTGTCT GGATTTTCGC  
5101 CATGCGCTGC TGAAAGTCGA CGTTGGTTCAG CAATGAACGC ATCTGACGAG  
5151 CCAAAGCATG GCTGGTGGTA AAGCGGGAAG CACGCTTGCC GATGCCGTGA  
5201 TAAACGATGC GTGACGCGAC GCCGGGCTGA TCAAAGGCCA GCGGAAGCGC  
5251 TAAAAGGGGC GTCCGGTAAT TAATCGCGTC CAGTACCGTA TTCATGCCGC  
5301 CGTGGGTGAT CGCCAGCTGC GCCTGAGACA GCGCGGCTGA CTGATCGGCA  
5351 AAATCCACCA CCTGTGTATG ACGGCTTCGC GCCAGCTCTT CACACTGAGA  
5401 GTCCGTAAGA CGACCACAGT GGGCTAACAG GAGCTGACCG TCAATTTCTT  
5451 CACAGGCTTT CACTATCGTT TTAAACAGCC CATAACGGTG TCCCTGAAGC  
5501 GTGCCAGCG AGGCGAAAAT CCGGGGTTTT TCTGAGGATG TAAAATAACG  
5551 GGATGAAGAC GTTGACGGTG CGTGCCTTTC GCGCAGAGGC CCGACGGCAT  
5601 GAAAACAAGC CGGTAACGCT TTGCGGGGAA AATCCAGTTC AGGAACAAGC  
5651 TGGCTGATTT GCGCCAGTGG CGAAAAACAC TGGTGAAGCT TTTGCCGGGG  
5701 GGCTAAGCCC ATTCTGTGGC TGTGTTCCGGC AATGACACGG TCATGACGAC  
5751 GCATTAGCCA GTCATAAATT TTTTCACTGG CGGCATAACG TTCGCGAGCC  
5801 GCGTCGCTGG TCCCGTATTC GAAAGGCATA ACCGCCAGGG GCATATCCGG  
5851 TTCACGATTG AGAGGCAGCG CGCAGGCGAC AGAGATAAAC GGCAGTCCCA  
5901 GTGCTTCAGC AACGAGCGCG CCTGCCGGTT CCATTTGATC AACAATGACG  
5951 CCATCGACGG CCAGATCGTT AAATGCCTGG GGGAGTTCGC GGCACAGCAT  
6001 ATCGGTGGTG CGCGCCATTT CATTGATGAG CTTCAGCATT GACGGCCCCA  
6051 GAGGATGAGC CGCCAGGTGT AGCACGCGCG TTAACGCGCC GGGGGGATGG  
6101 CTGTCTGTCC CGACGGAATG AAATCCAATG GTTTCGCTAT CGATCAAGTG  
6151 TTTAATATCG TATTGCTGAA TAAAGTCACC CGATGACCGC GCGCGACCAG  
6201 TTCCCTGAGCG AGATTCTGTA ATGCGCGAAC ATGGCTGTAA AAAGGCGGTG  
6251 CGATCGCCGC GAAATGGCTC ATGCAGCATC CTTAACTGAC GGCAGCGAGT  
6301 TTTTGTCAA ACCAGGCCTG AATAAAATGT TGAGTGGCGT GCCCGTGTG  
6351 GCAGGCCGCA GAGAGATGCT CACTGGCAAG CTGAAGATGT TGTCTCAGAC  
6401 GTTCTTCAAC CGCCCTCGGG CCTAACAGAT TGACCAGCGT CGATTTACCG  
6451 GCGTCCTGAT TGCTATCCTT ACCGGTGTCTG GTCATGCCAT CGGTCAAATC  
6501 GTCCAGCAGT TGAAATGCCT GACCAAGATC AAGTGAAAAA CGATGCAGGC  
6551 AATCACGCGC TTCGCTGGAG GCATTCGCAA CAATCGAGGC CATCTGCATG  
6601 GAGGCACAAA ACAGCGTGCT GGTTTTAAAG TGATTTCGTCA TCAAAATAGC  
6651 TTCAGCGCTG CGCGGCTTAT CCCCTTCAGA CAGATCCTTG AACTGACCCT  
6701 GAACCAATCC TTGCATGCCG ATGGCGTTTG ACAGTTCAGA AACCGCCCGA  
6751 TTTTTTGCCA GCGGCGTGAG GCCATCTGCA TCGGCAATTA CGCCAAAGGC  
6801 TTTACTCAGC AAGGCAACCG CCGCCAGTAT TGCCACATGC TCTCCGTAAT

6851 GAGAATGAAT GGTAGGGCGT CCGCGCCGCA GCTTCGCATC GTCCATGCAG  
6901 GGCATATCGT CAAGGATCAG CGAAGCCGCG TGGACCATT CCACCGCACA  
6951 GGCCAAATCC AGTAATCCGT CATGGCTGAC AGCGCAACCC AGATCGCGGG  
7001 CGGTCAGCAA CAGCAACATG GGGCGAATAC GTTTTCCCGG TGCCAGCGCA  
7051 CCTTCACGCA TCGCGGCACC CACAACATCC CGTTCCTCCCT CCACGGGCAA  
7101 TAACTGATCA AGGCGTCGAT CAATATCAGC CAGTAACTGC TCCGCAGCAT  
7151 CGCGAGTGAG ATGAACGTGT TTTTTTGCGC AGACCGTCAT TCGGGCTGTC  
7201 CTTATAAACG GATACATTTA CGGCAACGCG AAAGATGCGG TGCCCTTCAA  
7251 AAAGACGCTT AATCTGCCAT AACATGGTTG GCAGGCTTAC CCGTTATTTT  
7301 ACATTTAGGG TTACAGGTTT TTTTTGCTAA ATCCACATCG TTAATACTAG  
7351 TTGAGCTTGT GGAAAAGGTG GAAAATTCAT AAACCTCCGT CGGATTGGCA  
7401 GACCGTCCGA TCGTCCATTC CGACAGCATC GCCAGTCACT ATGGCGTGCT  
7451 GCTAGCGCTA TATGCGTTGA TGCAATTTCT ATGCGCACCC GTTCTCGGAG  
7501 CACTGTCCGA CCGCTTTGGC CGCCGCCAG TCTGCTCGC TTCGCTACTT  
7551 GGAGCCACTA TCGACTACG GATCATGGCG ACCACACCCG TCCTGTGGAT  
7601 CCTCTACGCC GGACGCATCG TGGCCGGCAT CACCGGCGCC ACAGGTGCGG  
7651 TTGCTGGCGC CTATATCGCC GACATCACCG ATGGGGAAGA TCGGGCTCGC  
7701 CACTTCGGGC TCATGAGCGC TTGTTTCGGC GTGGGTATGG TGGCAGGCC  
7751 CGTGGCCGGG GGACTGTTGG GCGCCATCTC CTTGCATGCA CCATTCCCTG  
7801 CGGCGGCGGT GCTCAACGCG CTCAACCTAC TACTGGGCTG CTTCTAATG  
7851 CAGGAGTCGC ATAAGGGAGA GCGTCGACCG ATGCCCTTGA GAGCCTTCAA  
7901 CCCAGTCAGC TCCTTCCGGT GGGCGCGGGG CATGACTATC GTCGCCGCAC  
7951 TTATGACTGT CTTCTTTATC ATGCAACTCG TAGGACAGGT GCCGGCAGCG  
8001 CTCTGGGTCA TTTTCGGCGA GGACCGCTTT CGCTGGAGCG CGACGATGAT  
8051 CGGCCTGTCG CTTGCGGTAT TCGGAATCTT GCACGCCCTC GCTCAAGCCT  
8101 TCGTCACTGG TCCC GCCACC AAACGTTTCG GCGAGAAGCA GGCCATTATC  
8151 GCCGGCATGG CGGCCGACGC GCTGGGCTAC GTCTTGCTGG CGTTTCGCGAC  
8201 GCGAGGCTGG ATGGCCTTCC CCATTATGAT TCTTCTCGCT TCCGGCGGCA  
8251 TCGGGATGCC CGCGTTGCAG GCCATGCTGT CCAGGCAGGT AGATGACGAC  
8301 CATCAGGGAC AGCTTCAAGG ATCGCTCGCG GCTCTTACCA GCCTAACTTC  
8351 GATCACTGGA CCGCTGATCG TCACGGCGAT TTATGCCGCC TCGGCGAGCA  
8401 CATGGAACGG GTTGGCATGG ATTGTAGGCG CCGCCCTATA CTTGTCTGTC  
8451 CTCCCCGCGT TGCGTCGCGG TGCATGGAGC CGGGCCACCT CGACCTGAAT  
8501 GGAAGCCGGC GGCACCTCGC TAACGGATTC ACCACTCCAA GAATTGGAGC  
8551 CAATCAATTC TTGCGGAGAA CTGTGAATGC GCAAACCAAC CTTTGGCAGA  
8601 ACATATCCAT CGCGTCCGCC ATCTCCAGCA GCCGCACGCG GCGCATCTCG  
8651 GGCAGCGTTG GGTCCCTGGCC ACGGGTGC GC ATGATCGTGC TCCTGTCTGT  
8701 GAGGACCCGG CTAGGCTGGC GGGGTTGCCT TACTGGTTAG CAGAATGAAT  
8751 CACCGATACG CGAGCGAACG TGAAGCGACT GCTGCTGCAA AACGTCTGCG  
8801 ACCTGAGCAA CAACATGAAT GGTCTTCGGT TTCCGTGTTT CGTAAAGTCT  
8851 GGAAACGCGG AAGTCCCCTA CGTGCTGCTG AAGTTGCCCG CAACAGAGAG  
8901 TGGAACCAAC CGGTGATACC ACGATACTAT GACTGAGAGT CAACGCCATG  
8951 AGCGGCCTCA TTTCTTATTC TGAGTTACAA CAGTCCGCAC CGCTGTCCGG  
9001 TAGTCTCTTC CGGTGGGCGC GGGGCATGAC TATCGTCGCC GCACTTATGA  
9051 CTGTCTTCTT TATCATGCAA CTCGTAGGAC AGGTGCCGGC AGCGCCCAAC  
9101 AGTCCCCCGG CCACGGGGCC TGCCACCATA CCCACGCCGA AACAAGCGCC  
9151 CTGCACCATT ATGTTCCGGA TCTGCATCGC AGGATGCTGC TGGCTACCCT  
9201 GTGGAACACC TACATCTGTA TTAACGAAGC GCTAACCGTT TTTATCAGGC  
9251 TCTGGGAGGC AGAATAAATG ATCATATCGT CAATTATTAC CTCCACGGGG  
9301 AGAGCCTGAG CAAACTGGCC TCAGGCATTT GAGAAGCACA CGGTCACACT  
9351 GCTTCCGGTA GTCAATAAAC CGGTAAACCA GCAATAGACA TAAGCGGCTA  
9401 TTTAACGACC CTGCCCTGAA CCGACGACCG GGTGCAATTT GCTTTTGAAT  
9451 TTCTGCCATT CATCCGCTTA TTATCACTTA TTCAGGCGTA GCACCAGGCG  
9501 TTTAAGGGCA CCAATAACTG CCTTAAAAAA ATTACGCCCC GCCCTGCCAC  
9551 TCATCGCAGT ACTGTTGTAA TTCATTAAGC ATTCTGCCGA CATGGAAGCC  
9601 ATCACAGACG GCATGATGAA CCTGAATCGC CAGCGGCATC AGCACCTTGT  
9651 CGCCTTGCGT ATAATATTTG CCCATGGTGA AAACGGGGGC GAAGAAGTTG  
9701 TCCATATTGG CCACGTTTAA ATCAAAACTG GTGAAACTCA CCCAGGGATT

9751 GGCTGAGACG AAAAACATAT TCTCAATAAA CCCTTTAGGG AAATAGGCCA  
 9801 GGTTTTACCC GTAACACGCC ACATCTTGCG AATATATGTG TAGAAACTGC  
 9851 CGGAAATCGT CGTGGTATTC ACTCCAGAGC GATGAAAACG TTTTCAGTTG  
 9901 CTCATGGAAA ACGGTGTAAC AAGGGTGAAC ACTATCCCAT ATCACCAGCT  
 9951 CACCGTCTTT CATTGCCATA CGGAATTCCG GATGAGCATT CATCAGGCGG  
 10001 GCAAGAATGT GAATAAAGGC CGGATAAAAC TTGTGCTTAT TTTTCTTTAC  
 10051 GGTCTTTAAA AAGGCCGTAA TATCCAGCTG AACGGTCTGG TTATAGGTAC  
 10101 ATTGAGCAAC TGA CTGAAAT GCCTCAAAAT GTTCTTTACG ATGCCATTGG  
 10151 GATATATCAA CGGTGGTATA TCCAGTGATT TTTTCTCCA TTTTAGCTTC  
 10201 CTTAGCTCCT GAAAATCTCG ATA ACTCAA AAATACGCC GGTAGTGATC  
 10251 TTATTTTCATT ATGGTGAAAG TTGGAACCTC TTACGTGCCG ATCAACGTCT  
 10301 CATTTTCGCC AAAAGTTGGC CCAGGGCTTC CCGGTATCAA CAGGGACACC  
 10351 AGGATTTTATT TATTCTGCGA AGTGATCTTC CGTCACAGGT ATTTATTCGG  
 10401 CGCAAAGTGC GTCGGGTGAT GCTGCCAACT TACTGATTTA GTGTATGATG  
 10451 GTGTTTTTGA GTGCTCCAG TGGCTTCTGT TTCTATCAGC TGTCCTCCT  
 10501 GTTCAGCTAC TGACGGGGTG GTGCGTAACG GCAAAGCAC CGCCGGACAT  
 10551 CAGCGCTAGC GGAGTGATA CTGGCTTACT ATGTTGGCAC TGATGAGGGT  
 10601 GTCAGTGAAG TGCTTCATGT GGCAGGAGAA AAAAGGCTGC ACCGGTGCGT  
 10651 CAGCAGAATA TGTGATACAG GATATATTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC  
 10701 GCTACGCTCG GTCGTTTCGAC TCGGGCAGC GGAAATGGCT TACGAACGGG  
 10751 GCGGAGATTT CCTGGAAGAT GCCAGGAAGA TACTTAACAG GGAAGTGAGA  
 10801 GGGCCGCGGC AAAGCCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCG TGACAAGCAT  
 10851 CAGGAAATCT GACGCTCAA TCAGTGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA  
 10901 AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGCGGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTT  
 10951 CTGCCTTTTCG GTTTACCGGT GTCATTCCGC TGTTATGGCC GCGTTTGTCT  
 11001 CATTCCACGC CTGACACTCA GTTCCGGGTA GGCAGTTCGC TCCAAGCTGG  
 11051 ACTGTATGCA CGAACCPCCG GTTTCAGTCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT  
 11101 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGAAGA CATGCAAAG CACCCTGGC  
 11151 AGCAGCCACT GGTAATTGAT TTAGAGGAGT TAGTCTTGAA GTCATGCGCC  
 11201 GGTTAAGGCT AAAGTGAAG GACAAGTTTT GGTGACTGCG CTCCTCCAAG  
 11251 CCAGTTACCT CGGTTCAAAG AGTTGGTAGC TCAGAGAACC TTCGAAAAAC  
 11301 CGCCCTGCAA GGCGGTTTTT TCGTTTTTTCAG AGCAAGAGAT TACGCGCAGA  
 11351 CAAAACGAT CTCAAGAAGA TCATCTTATT AATCAGATAA AATATTTCTA  
 11401 GATTTTCAGTG CAATTTATCT CTTCAAATGT AGCACCTGAA GTCAGCCCCA  
 11451 TACGATATAA GTTGTAATTC TCATGTTTGA CAGCTTATCA TCGATAAGCT  
 11501 TTAATGCGGT AGTTTATCAC AGTTAAATTG CTAACGCAGT CAGGCACCGT  
 11551 GTAT

**pGAMMA**

1 GAATTCCGGA TGAGCATTCA TCAGGCGGGC AAGAATGTGA ATAAAGGCCG  
 51 GATAAACTT GTGCTTATTT TTCTTTACGG TCTTTAAAAA GGCCGTAATA  
 101 TCCAGCTGAA CGGTCTGGTT ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAATGC  
 151 CTCAAAATGT TCTTTACGAT GCCATTGGGA TATATCAACG GTGGTATATC  
 201 CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCCCT TAGCTCCTGA AAATCTCGAT  
 251 AACTCAAAAA ATACGCCCGG TAGTGATCTT ATTTTCATTAT GGTGAAAAGTT  
 301 GGAACCTCTT ACGTGCCGAT CAACGTCTCA TTTTCGCCAA AAGTTGGCCC  
 351 AGGGCTTCCC GGTATCAACA GGGACACCAG GATTTATTTA TTCTGCGAAG  
 401 TGATCTTCCG TCACAGGTAT TTATTCCGCG CAAAGTGCGT CGGGTGATGC  
 451 TGCCAACTTA CTGATTTAGT GTATGATGGT GTTTTTGAGG TGCTCCAGTG  
 501 GCTTCTGTTT CTATCAGCTG TCCCTCCTGT TCAGCTACTG ACGGGGTGGT  
 551 GCGTAACGGC AAAAGCACCG CCGGACATCA GCGCTAGCGG AGTGTATACT  
 601 GGCTTACTAT GTTGGCACTG ATGAGGGTGT CAGTGAAGTG CTTTATGTGG  
 651 CAGGAGAAAA AAGGCTGCAC CGGTGCCTCA GCAGAATATG TGATACAGGA  
 701 TATATTCCGC TTCTCGCTC ACTGACTCGC TACGCTCGGT CGTTGACTG  
 751 CGGCGAGCGG AAATGGCTTA CGAACGGGGC GGAGATTTCC TGGAAGATGC  
 801 CAGGAAGATA CTTAACAGGG AAGTGAGAGG GCCGCGGCAA AGCCGTTTTT  
 851 CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACAAGCATCA CGAAATCTGA CGCTCAAATC  
 901 AGTGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT

951 GGCGGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCTT GCCTTTCGGT TTACCGGTGT  
 1001 CATTCCGCTG TTATGGCCGC GTTTGTCTCA TTCCACGCCT GACACTCAGT  
 1051 TCCGGGTAGG CAGTTCGCTC CAAGCTGGAC TGTATGCACG AACCCCCCGT  
 1101 TCAGTCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC  
 1151 CGAAAAGACA TGCAAAAAGCA CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAATTGATTT  
 1201 AGAGGAGTTA GTCTTGAAGT CATGCGCCGG TTAAGGCTAA ACTGAAAGGA  
 1251 CAAGTTTTGG TGA CTGCGCT CCTCCAAGCC AGTTACCTCG GTTCAAAGAG  
 1301 TTGGTAGCTC AGAGAACCTT CGAAAAACCG CCCTGCAAGG CGGTTTTTTC  
 1351 GTTTTTCAGAG CAAGAGATTA CGCGCAGACC AAAACGATCT CAAGAAGATC  
 1401 ATCTTATTAA TCAGATAAAA TATTTCTAGA TTTCAAGTCA ATTTATCTCT  
 1451 TCAAATGTAG CACCTGAAGT CAGCCCCATA CGATATAAGT TGTAATTCTC  
 1501 ATGTTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG TTTATCACAG  
 1551 TTAAATGCTT AACGCAGTCA GGCACCGTGT ATGAAATCTA ACAATGCGCT  
 1601 CATCGTCATC CTCGGCACCC TCACCCTGGA TGCTGTAGGC ATAGGCTTGG  
 1651 TTATGCCGGT ACTGCCGGGC CTCTTGCGGG ATCGAGCTCG TCTCTGTAA  
 1701 AATTGAATCC TTAAGCCTGC TGCCAGACGT TGCATCACGC CGTCAGGGGC  
 1751 AAAGAAGGTT GTGTTTCTTT TGGCTTCTC TATGCGCCGC CCCTGTCAAA  
 1801 ACTTCAGGCG ACGTCCGGG AAAGACATGG CGCTAGAGCG GCGCTGCCA  
 1851 GAGATGCGCA GGGCGGGGAG GATGAGCCCG CATCCGGGAA GTAAGGCCCT  
 1901 GACCAGAGGC GGCCAGCAGC AGCGTTAATT TTTCCGGCGT GGTCGTTGAC  
 1951 TGCCGCTGAT CCCAGGCTTG CTGACCGGCC TGTTCAACTT TGACACCTAT  
 2001 TTTCCGGTAA ACCTGCTTCG CCGTAGCGAT TGCCAGGCG GAACGCAGGG  
 2051 GCAACCCTGC CAGGCCGGCT GTGGCAGACA AATAGTAAGG TTCTGCTTCC  
 2101 TGCACCAAC GACGGGCGAT ACGGCTCAGC GCCTGACGGT TTTAGGTGC  
 2151 CGCATAATTC TCTTTGTTCA GACCTTCATG CTCCAGCCAG CTTGCCGGCA  
 2201 GATAACAGCG GCCCGCATGC GCATCGTCCA CAATATCGCG AGCAATATTG  
 2251 GTCAACTGAA ATGCCAGCCC AAGGTCACAG GCGCGGTCCA GCGTGGCGTT  
 2301 ATCCCGCACG CCCATGATTT GCGCCATCAT CAAGCCGACA ACGCCTGCAA  
 2351 CGTGATAGCA ATAGCGCAGC GTATCATCCA GTTGGCTGTA TTGCGCTTCG  
 2401 CGTACATCCA TGCGGAAGCC TTCCAGATGA TCAAACGCGT AAGCCGGGGC  
 2451 GATATCATGA GCCATAGCCA CTTCTGAAA AGCCGCAAAC GCCGGTTCGT  
 2501 GCATCTGCGA TCCTGCATAG GCCTGGCGCG TTTTCATCTC AAGTTGCATC  
 2551 AGACGTTGTT CGGGCGTTTG TAAGGCAGGC TGCCGGGCCT GAAAGCCCAG  
 2601 CGTCTGATCG TCAATAACAT CGTCACAATG GCGGCACCAG GCGTAGAGCA  
 2651 TCAGTACGCT GCGCCGGGTT TTTGCATCAA ATAAC TTTGA GGCTGTGCGA  
 2701 AAAC TTTTCG AGCCAACTGC CATCGTTTCG ACCGCATGAT TGAGTAACGA  
 2751 CGGATTATTC ATATCAGATC CTCCAGCATC AAACCTGCTG TCGCTTTTGC  
 2801 CGAGCCGATG ACGCCAGGAA TGCCTGCGCC GGGATGCGTG CCTGCGCCGA  
 2851 CCAGGTAGAG ATTAGTAATG GTTTTATCGC GGTATGCGG CCGAAACCAG  
 2901 GCGCTCTGGG TAAGAACGGG CTCCACAGAA AAGGCTGAGC CATGATAGGC  
 2951 ATTAAGCTGG TCGCGAAAAT CAAACGGCGT AAACATCCGG TGCGTGACCA  
 3001 GCTGACTCCG TAAGCCAGGC ATGTAATGCT GCTCAAGGTA CGCAAAAATA  
 3051 CGGTGCGGTA GTTTTGGCCC CTCAACCGTC CAGTCGAGGT TCGCGGTGCC  
 3101 TAAATGCGGC ACCGGCGCCA ACACATAGTA ACTGCCGCAA CCTTCAGGCG  
 3151 CCAGTGACGA ATCCGTGACA CAGGGCGCGT GCAGATAAAG TGAGAAGTCC  
 3201 TCTGCGAGGC CATCATGATT AAAAA TTTTCG TCAATCAGCT CGCGGTAACG  
 3251 CGGGCCGAAA CAAACCGTGT GATGCGCGAG CTGATCATGA TGGTGATTCA  
 3301 AACCAAAATA GAGCACAAAC AGAGAGTTAC TCATGCGCTT AGTCTGCAGT  
 3351 TTGTTGGACT GCTTAACCGC GGCAGGGTGC TGGCTTAACA GGTCGCGATA  
 3401 GGTATGAACC ACATCTGCAT TTGACGCGAC GGCTTGCCTC AGGAACCTGC  
 3451 GACCGTCTCT TAAATGCACG GCTTCAATCT TGTTCCTGT CGTTTCCATA  
 3501 TGGCTGACTC TGGCGTTTAA CACGACTTCG CCACCCAGAT CCTGAAACAG  
 3551 CTTTATCATC CCCTGAACTA ATGCGCCGGT GCCGCCACGC GGAAACCAGA  
 3601 CGCCCCACTC ACGCTCCAGC GCGTGTATCA ACGTATAAAT GGATGAGGTG  
 3651 GCGAAGGGAT TGCCGCCAC CAACAGCGAG TGGAAGAAA ACGCCTGGCG  
 3701 CAGATGTTCA TCTTCGATGT AACTGGCAAC CTTACTGTAA ACGCTTCTCC  
 3751 ATGCCTGCAG TTTCCGAGT TGAGGTGCGG CGCGAAGCAT GTCTCTGAAC  
 3801 GATAAAAAAG GGACAGTACC GAGCTTTAGA TAGCCTTCTT TAAACACCGC

3851 GCGTGAATAG TCCAGAAACT GACGATAACC TTCGACATCG CGGGGATTAA  
3901 ACTGCTGAAT CTGCGCTTCG AGCCGGGTTT GATCGTTATC GTAATTTAAAG  
3951 ACCTTCCCTG ACTCCCAACA CAGGCGGTAA AACGGCGTAA CCGGCAGCAG  
4001 TTCGACATAC TCTTTTAACT GTTTTCTGTC CAGTGCAAAC AGTTCTTCAA  
4051 TGGCACTGGG ATCGGTGATA ACCGTCGGGC CTGCATCAA GGTAAACCCC  
4101 TGATCCTCGT AGACATAAGC CCGACCGCCG GTTTATCAC GTTGTTC AAG  
4151 CAGTAAGACG GGGATCCCCG CAGCTTGTAG ACGAATTGCC AGTGCCAGGC  
4201 CACCGAAGCC TGCACCAATT ACCGTAGTTG GTTTCATGTA GTCGCTCTTT  
4251 AACGATGAGT CGTCATAATG GCTTGCAATG CTGCTAATAC CGGAACAGGC  
4301 GGCTTGCCGC TCAGAATACG TATTAAGATC TGGTGCTGAA CGCCTTCTCC  
4351 ACCACCTCCA CCACCGCCAT GTCGGCGCCG CTCGAGTTGG CGGACACGAA  
4401 GCGGCGGCG TCGCTGGCCA CGTCCGCGGC GCGCGGGCG GCGGCGGCG  
4451 CGGAGCGCGC GCGGCGTCC ACTGCGTCTT TCGCCTCCTT GAGCGACATT  
4501 GTGTCTGGGT AGTAGCCGCT TCCCAGTGTG GCGCCAGTC CCGACACAT  
4551 CACCACCAGG CCGGGATGC CCAGCTGCAG CAGGCTGGCG CGAGCCTGGT  
4601 TGGAGCTCTT CCAGAACAGC GTCAGGCCAA ACACAATCAG CTGCGGCAGC  
4651 GACAGGCGTG TGGACAGGAA GCCGTGCCAG TGGAAGTCAC TGAGGCTGAA  
4701 GAACGCCCTG AAGAACTCCC GGATCTGCGG CAGGTTGAGC TTGAGCAGCA  
4751 CGTCCATGCC AAAGGTGAAG AAGGCGCGCT GCCGCACGCG CTCCAGCGGC  
4801 CAGGTGGCGG CCCACACGCG GCGGCCATG GACTCCGCCT CCGCCTCGCT  
4851 GGAGGGGCGC AGCGGGGCGC CTGACTCGCT GGCCTTGTG GCGGGGCGAC  
4901 TGAGCTGATC CACAATGGTG TCGGCAACCG TGGGCGCCG GCCCATCATG  
4951 CGGCTGATCA TGAAGCCCCT GGAGGGATGC ACCATGCCCG CTGTGCCGCC  
5001 AATGGCCAGC ACGCGCTGTG GGTGTTTGG CAGCACGCCG CCCATGGGGA  
5051 TGAGGCAGTA CTCTCCTCC AGCACGTTGG TCACCTTGAT CCCCAGGTGC  
5101 TGCAGCCGCG CCTGCAGGCG GTCCTTGAGC TCGGGGAAGT CCACCGCGGG  
5151 CCGCGACACC AGGCTGGTCT CCTCCAGGAA CACCAGGTTT TTGGTGAAGG  
5201 GCATGGCGTA CAGGAAGGTG GGCAGCGCGG TGTTGGCTGC GCGCATGGCC  
5251 TCCAGCCCCG GCGCCTGCGT GTGGTCTGTC CGCCAGTCCA TGAACAGCAT  
5301 GGTGTCCAGC GCAAACGGGT GAGACTCAAC CTCCGCCACA ATGCCGTACG  
5351 CGCCCTGGAA GCCCGGGTCG AACTTCTTGT CGTACTGCAC CAGGCGGCGC  
5401 GAGTGGCCGG TGGCGTCCAG GACCAGGCTG CCGCGGATCT CCGGCGGTC  
5451 CGCCAGCTTG ACGGCGCTGC AGCCGCGCC GTGACTCACG CCCGACACCT  
5501 TGGCGTCAAG GAACGTCACG CCCGAGGCGA CGCAGCGCTC CAGCAGGATG  
5551 CGCTTACGCT TGGGCCGGTC CACGCGGCCG AAGGGGCGGT TCAGGAACTT  
5601 CTCGCCGTCG GCCTCGCTGT TGAGCCAGAC CTTGGCCTTG GGCCAGATGA  
5651 CGTGCAGGCA GTCTCCAGC CCCATCGCCT GGAATCCTC GAGCCAGACA  
5701 CCATAGTTGT TGGGCCAGTG GGCCAGCGGC TCGGGGTGCA CAACGCAAAC  
5751 TGAGAAGCCC GCGGCAGCGA CGCGGGAGGC CACCGCGACA CCAGCCGGGC  
5801 CCGCGCCAGC CACCACCAGG TCAACATAGT CTACCTCGTT TAAGTCATGC  
5851 GGCTGAAGCC TAACGGTCTC AGAGGTGGGC CATTTCTCGG TCTCGCGGTA  
5901 GAAGTGCCCA ACGGGGCCAG GCGGAATAGG ATACGGCCCG GACGGAAATG  
5951 CGTCTTCTG ACCCACGAGA ATCAGATCAT AATGCGGTTG CATAGCCGCT  
6001 CCCACTTAAG ACAGGCTGAC CGGTGCACAT AACCTGCTCA ATGATATCGG  
6051 CAGCGGCCAT GGTGCCCCCT GCCAAACGAA GGGCTGTCTG GATTTTCGCC  
6101 ATGCGCTGCT GAAAGTCGAC GTTGGTCAGC AATGAACGCA TCTGACGAGC  
6151 CAAAGCATGG CTGGTGGTAA AGCGGGAAGC ACGCTTGCCG ATGCCGTGAT  
6201 AAACGATGCG TGACGCGACG CCGGGCTGAT CAAAGGCCAG CGGAAGCGCT  
6251 AAAAGGGGCG TCCGGTAATT AATCGCGTCC AGTACCGTAT TCATGCCGCC  
6301 GTGGGTGATC GCCAGCTGCG CCTGAGACAG CGCGGCTGAC TGATCGGCAA  
6351 AATCCACCAC CTGTGTATGA CGGCTTCGCG CCAGCTCTTC AACTGAGAG  
6401 TCCGTAAGAC GACCACAGTG GGCTAACAGG AGCTGACCGT CAATTTCTTC  
6451 ACAGGCTTTC ACTATCGTTT TAAACAGCCC ATAACGGTGT CCCTGAAGCG  
6501 TGCCAGCGA GCGGAAAATC CGGGGTTTTT CTGAGGATGT AAAATAACGG  
6551 GATGAAGACG TTGACGCTGC GTGCGTTTTG CGCAGAGGCC CGACGGCATG  
6601 AAAACAAGCC GGTAAACGCTT TGCGGGGAAA ATCCAGTTCA GGAACAAGCT  
6651 GGCTGATTTG CGCCAGTGGC GAAAAACACT GGTGAAGCTT TTGCCGGGGG  
6701 GCTAAGCCCA TTCTGTGGCT GTGTTTCGCA ATGACACGGT CATGACGAGC  
6751 CATTAGCCAG TCATAAATTT TTTCACTGGC GGCATAACGT TCGCGAGCCG

6801 CGTCGCTGGT CCCGTATTCG AAAGGCATAA CCGCCAGGGG CATATCCGGT  
6851 TCACGATTGA GAGGCAGCGC GCAGGCGACA GAGATAAACG GCAGTCCCAG  
6901 TGCTTCAGCA ACGAGCGCGC CTGCCGGTTC CATTTGATCA ACAATGACGC  
6951 CATCGACGGC CAGATCGTTA AATGCCTGGG GGAGTTCGCG GCACAGCATA  
7001 TCGGTGGTGC GCGCCATTTT ATTGATGAGC TTCAGCATTG ACGGCCCCAG  
7051 AGGATGAGCC GCCAGGTGTA GCACGCGCGT TAACGCGCCG GGGGGATGGC  
7101 TGTCTGTCCC GACGGAATGA AATCCAATGG TTTGCTATC GATCAAGTGT  
7151 TTAATATCGT ATTGCTGAAT AAAGTCACCC GATGACCCG CGCGACCAGT  
7201 TCCTGAGCGA GATTCTGTAA TGC CGCAACA TGGCTGTAAA AAGGCGGTGC  
7251 GATCGCCGCG AAATGGCTCA TGCAGCATCC TTAAGTACG GCAGCGAGTT  
7301 TTTTGTCAA CCAGGCCTGA ATAAAATGTT GAGTGGCGTG CCCGTGTTGG  
7351 CAGGCCGACG AGAGATGCTC ACTGGCAAGC TGAAGATGTT GTCTCAGACG  
7401 TTCTTCAACC GCCCTCGGGC CTAACAGATT GACCAGCGTC GATTTACCGG  
7451 CGTCCCTGATT GCTATCCTTA CCGGTGTCGG TCATGCCATC GGTCAAATCG  
7501 TCCAGCAGTT GAAATGCCTG ACCAAGATCA AGTGAAAAAC GATGACGGCA  
7551 ATCAGCGCT TCGCTGGAGG CATTGCAAC AATCGAGGCC ATCTGCATGG  
7601 AGGCACAAAA CAGCGTGCTG GTTTTAAAGT GATTCGTCAT CAAAATAGCT  
7651 TCAGCGCTGC GCGGCTTATC CCCTTCAGAC AGATCCTTGA ACTGACCCTG  
7701 AACCAATCCT TGCATGCCGA TGGCGTTTGA CAGTTCAGAA ACCGCCCGAT  
7751 TTTTGTCCAG CGGCGTGAGG CCATCTGCAT CGGCAATTAC GCCAAAGGCT  
7801 TTAAGTCAAG AGGCAACCGC CGCCAGTATT GCCACATGCT CTCCGTAATG  
7851 AGAATGAATG GTAGGGCGTC CGCGCCGCGC CTTGCGATCG TCCATGCAGG  
7901 GCATATCGTC AAGGATCAGC GAAGCCGCGT GGACCATTTC CACCGCACAG  
7951 GCCAAATCCA GTAATCCGTC ATGGCTGACA GCGCAACCCA GATCGCGGGC  
8001 GGTCAGCAAC AGCAACATGG GGCGAATACG TTTTCCCGGT GCCAGCGCAC  
8051 CTTCACGCAT CGCGGCACCC ACAACATCCC GTTCTCCCTC CACGGGCAAT  
8101 AACTGATCAA GGCGTCGATC AATATCAGCC AGTAACTGCT CCGCAGCATC  
8151 GCGAGTGAGA TGAACGTGTT TTTTGTGCGC GACCGTCATT CGGGCTGTCC  
8201 TTATAAACGG ATACATTTAC GGCAACGCGA AAGATGCGGT GCCCTTCAA  
8251 AAGACGCTTA ATCTGCCATA ACATGGTTGG CAGGCTTACC CGTTATTTTA  
8301 CATTTAGGGT TACAGGTTTT TTTTGTGAAA TCCACATCGT TAATACTAGT  
8351 TGAGCTTGTG GAAAAGGTGG AAAATTCATA AACCTCCGTC GGATTGGCAG  
8401 ACCGTGCGAT CGTCCATTCC GACAGCATCG CCAGTACTA TGGCGTGCTG  
8451 CTAGCGCTAT ATGCGTTGAT GCAATTTCTA TGCGCACCCG TTCTCGGAGC  
8501 ACTGTCCGAC CGCTTTGGCC GCCGCCAGT CCTGCTCGCT TCGCTACTTG  
8551 GAGCCACTAT CGACTACGCG ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC  
8601 CTCTACGCCG GACGCATCGT GGCCGGCATC ACCGGCGCCA CAGGTGCGGT  
8651 TGCTGGCGCC TATATCGCCG ACATCACCGA TGGGGAAGAT CGGGCTCGCC  
8701 ACTTCGGGCT CATGAGCGCT TGTTCGGCG TGGGTATGGT GGCAGGCCCC  
8751 GTGGCCGGGG GACTGTTGGG CGCCATCTCC TTGCATGCAC CATTCCCTTG  
8801 GGCGGCGGTG CTCAACGGCC TCAACCTACT ACTGGGCTGC TTCTAATGC  
8851 AGGAGTCGCA TAAGGGAGAG CGTCGACCGA TGCCCTTGAG AGCCTTCAAC  
8901 CCAGTCAGCT CCTTCCGGTG GGCGCGGGG ATGACTATCG TCGCCGCACT  
8951 TATGACTGTC TTCTTTATCA TGCAACTCGT AGGACAGGTG CCGGCAGCGC  
9001 TCTGGGTCAT TTTCCGGCAG GACCGCTTTC GCTGGAGCGC GACGATGATC  
9051 GGCTGTGCGC TTGCGGTATT CGGAATCTTG CACGCCCTCG CTCAAGCCTT  
9101 CGTCACTGGT CCCGCCACCA AACGTTTCGG CGAGAAGCAG GCCATTATCG  
9151 CCGGCATGGC GGCCGACGCG CTGGGCTACG TCTTGCTGGC GTTCGCGACG  
9201 CGAGGCTGGA TGGCCTTCCC CATTATGATT CTTCTCGCTT CCGGCGGCAT  
9251 CGGGATGCCG GCGTTGCAGG CCATGCTGTC CAGGCAGGTA GATGACGACC  
9301 ATCAGGGACA GCTTCAAGGA TCGCTCGCGG CTCTTACCAG CCTAACTTCG  
9351 ATCACTGGAC CGCTGATCGT CACGGCGATT TATGCCGCCT CCGCGAGCAC  
9401 ATGGAACGGG TTGGCATGGA TTGTAGGCGC CGCCCTATAC CTTGTCTGCC  
9451 TCCCCGCGTT GCGTCGCGGT GCATGGAGCC GGGCCACCTC GACCTGAATG  
9501 GAAGCCGGCG GCACCTCGCT AACGGATTCA CCACTCCAAG AATTGGAGCC  
9551 AATCAATTCT TGCGGAGAAC TGTGAATGCG CAAACCAACC CTTGGCAGAA  
9601 CATATCCATC GCGTCCGCCA TCTCCAGCAG CCGCACGCGG CGCATCTCGG  
9651 GCAGCGTTGG GTCTTGCCCA CGGGTGCGCA TGATCGTGCT CCTGTCTGTTG

9701 AGGACCCGGC TAGGCTGGCG GGGTTGCCTT ACTGGTTAGC AGAATGAATC  
 9751 ACCGATACGC GAGCGAACGT GAAGCGACTG CTGCTGCAAA ACGTCTGCGA  
 9801 CCTGAGCAAC AACATGAATG GTCTTCGGTT TCCGTGTTTC GTAAAGTCTG  
 9851 GAAACGCGGA AGTCCCCTAC GTGCTGCTGA AGTTGCCCGC AACAGAGAGT  
 9901 GGAACCAACC GGTGATACCA CGATACTATG ACTGAGAGTC AACGCCATGA  
 9951 GCGGCCTCAT TTCTTATTCT GAGTTACAAC AGTCCGCACC GCTGTCCGGT  
 10001 AGTCTCTTCC GGTGGGCGCG GGGCATGACT ATCGTCGCCG CACTTATGAC  
 10051 TGCTTCTTT ATCATGCAAC TCGTAGGACA GGTGCCGGCA GCGCCCAACA  
 10101 GTCCCCCGGC CACGGGGCCT GCCACCATAC CCACGCCGAA ACAAGCGCCC  
 10151 TGCACCATTA TGTTCCGGAT CTGCATCGCA GGATGCTGCT GGCTACCCTG  
 10201 TGAACACCT ACATCTGTAT TAACGAAGCG CTAACCGTTT TTATCAGGCT  
 10251 CTGGGAGGCA GAATAAATGA TCATATCGTC AATTATTACC TCCACGGGGA  
 10301 GAGCCTGAGC AAACCTGGCCT CAGGCATTTG AGAAGCACAC GGTCCACTG  
 10351 CTTCGGGTAG TCAATAAACCT GGTAACCAG CAATAGACAT AAGCGGCTAT  
 10401 TTAACGACCC TGCCCTGAAC CGACGACCGG GTCGAATTTG CTTTCGAATT  
 10451 TCTGCCATTC ATCCGCTTAT TATCACTTAT TCAGGCGTAG CACCAGGCGT  
 10501 TTAAGGGCAC CAATAACTGC CTTAAAAAAA TTACGCCCG CCCTGCCACT  
 10551 CATCGCAGTA CTGTTGTAAT TCATTAAGCA TTCTGCCGAC ATGGAAGCCA  
 10601 TCACAGACGG CATGATGAAC CTGAATCGCC AGCGGCATCA GCACCTTGTC  
 10651 GCCTTGCGTA TAATATTTGC CCATGGTGAA AACGGGGGCG AAGAAGTTGT  
 10701 CCATATTGGC CACGTTTAAA TCAAAACTGG TGAAACTCAC CCAGGGATTG  
 10751 GCTGAGACGA AAAACATATT CTCAATAAAC CCTTTAGGGA AATAGGCCAG  
 10801 GTTTTCACCG TAACACGCCA CATCTTGCGA ATATATGTGT AGAAACTGCC  
 10851 GGAAATCGTC GTGGTATTCA CTCCAGAGCG ATGAAAACGT TTCAGTTTGC  
 10901 TCATGAAAA CGGTGTAACA AGGGTGAACA CTATCCATA TCACCAGCTC  
 10951 ACCGTCTTTC ATTGCCATAC G

## pLUTEIN

1 GAATTCGGGA TGAGCATTCA TCAGGCGGGC AAGAATGTGA ATAAAGGCCG  
 51 GATAAAACTT GTGCTTATTT TTCTTTACGG TCTTTAAAAA GGCCGTAATA  
 101 TCCAGCTGAA CGGTCTGGTT ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAATGC  
 151 CTCAAATGT TCTTTACGAT GCCATTGGGA TATATCAACG GTGGTATATC  
 201 CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCCT TAGCTCCTGA AAATCTCGAT  
 251 AACTCAAAAA ATACGCCCGG TAGTGATCTT ATTTCAATTAT GGTGAAAGTT  
 301 GGAACCTCTT ACGTGCCGAT CAACGTCTCA TTTTCGCCAA AAGTTGGCCC  
 351 AGGGCTTCCC GGTATCAACA GGGACACCAG GATTTATTTA TTCTGCGAAG  
 401 TGATCTTCCG TCACAGGTAT TTATTCCGGC CAAAGTGCGT CGGGTGATGC  
 451 TGCCAACCTA CTGATTTAGT GTATGATGGT GTTTTTGAGG TGCTCCAGTG  
 501 GCTTCTGTTT CTATCAGCTG TCCCTCCTGT TCAGCTACTG ACGGGGTGGT  
 551 GCGTAACGGC AAAAGCACCG CCGGACATCA GCGCTAGCGG AGTGTATACT  
 601 GGCTTACTAT GTTGGCACTG ATGAGGGTGT CAGTGAAGTG CTTTATGTGG  
 651 CAGGAGAAAA AAGGCTGCAC CGGTGCCTCA GCAGAATATG TGATACAGGA  
 701 TATATTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TACGCTCGGT CGTTCCGACTG  
 751 CGGCGAGCGG AAATGGCTTA CGAACGGGGC GGAGATTTCC TGGAAGATGC  
 801 CAGGAAGATA CTTAACAGGG AAGTGAGAGG GCCGCGGCAA AGCCGTTTTT  
 851 CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACAAGCATCA CGAAATCTGA CGCTCAAATC  
 901 AGTGGTGGCG AAACCCGACA GGAATAAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT  
 951 GGCGGCTCCC TCGTGCCTC TCCTGTTTCT GCCTTTTCGGT TTACCGGTGT  
 1001 CATTCCGCTG TTATGGCCGC GTTTGTCTCA TTCCACGCCT GACTCAGT  
 1051 TCCGGGTAGG CAGTTCGCTC CAAGCTGGAC TGTATGCACG AACCCCCCGT  
 1101 TCAGTCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC  
 1151 CGGAAAGACA TGCAAAAAGCA CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAATTGATTT  
 1201 AGAGGAGTTA GTCTTGAAGT CATGCGCCGG TTAAGGCTAA ACTGAAAGGA  
 1251 CAAGTTTTGG TGAAGTGCCT CCTCCAAGCC AGTTACCTCG GTTCAAAGAG  
 1301 TTGGTAGCTC AGAGAACCTT CGAAAAACCG CCCTGCAAGG CGGTTTTTTC  
 1351 GTTTTCAGAG CAAGAGATTA CGCGCAGACC AAAACGATCT CAAGAAGATC  
 1401 ATCTTATTAA TCAGATAAAA TATTTCTAGA TTTTCAGTGCA ATTTATCTCT



1451 TCAAATGTAG CACCTGAAGT CAGCCCCATA CGATATAAGT TGTAATTCTC  
1501 ATGTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG TTTATCACAG  
1551 TTAAATTGCT AACGCAGTCA GGCACCGTGT ATGAAATCTA ACAATGCGCT  
1601 CATCGTCATC CTCGGCACCG TCACCCTGGA TGCTGTAGGC ATAGGCTTGG  
1651 TTATGCCGGT ACTGCCGGGC CTCTTGCGGG ATCGAGCTCG TCTCTGTAA  
1701 AATTGAATCC TTAAGCCTGC TGCCAGACGT CTCTACCGGA GAAATTATGT  
1751 TGTGGATTTG GAATGCCCTG ATCGTTTTTCG TTACCGTGAT TGGCATGGAA  
1801 GTGATTGCTG CACTGGCACA CAAATACATC ATGCACGGCT GGGGTTGGGG  
1851 ATGGCATCTT TCACATCATG AACCGCGTAA AGGTGCGTTT GAAGTTAACG  
1901 ATCTTTATGC CGTGGTTTTT GCTGCATTAT CGATCCTGCT GATTTATCTG  
1951 GGCAGTACAG GAATGTGGCC GCTCCAGTGG ATTGGCGCAG GTATGACGGC  
2001 GTATGGATTA CTCTATTTTA TGGTGCACGA CGGGCTGGTG CATCAACGTT  
2051 GGCCATTCCG CTATATTCCA CGCAAGGGCT ACCTCAAACG GTTGTATATG  
2101 GCGCACCGTA TGCATCACGC CGTCAGGGGC AAAGAAGGTT GTGTTTTCTT  
2151 TGGCTTCCTC TATGCGCCGC CCCTGTCAAA ACTTCAGGCG ACGCTCCGGG  
2201 AAAGACATGG CGCTAGAGCG GGCGCTGCCA GAGATGCGCA GGGCGGGGAG  
2251 GATGAGCCCG CATCCGGGAA GTAAGGGCCT GACCAGAGGC GGCCAGCAGC  
2301 AGCGTTAATT TTTCCGGCGT GGTGCTTGAC TGCCGCTGAT CCCAGGCTTG  
2351 CTGACCGGCC TGTTCAACTT TGACACCTAT TTTCCGGTAA ACCTGCTTCG  
2401 CCGTAGCGAT TGCCAGGGC GAACGCAGGG GCAACCCTGC CAGGCCGGCT  
2451 GTGGCAGACA AATAGTAAGG TTCTGCTTCC TGCACCAAAC GACGGCGGAT  
2501 ACGGCTCAGC GCCTGACGGT TTTGAGGTGC CGCATAATTC TCTTTGTTCA  
2551 GACCTTCATG CTCCAGCCAG CTTGCCGGCA GATAACAGCG GCCCGCATGC  
2601 GCATCGTCCA CAATATCGCG AGCAATATTG GTCAACTGAA ATGCCAGCCC  
2651 AAGGTCACAG GCGCGGTCCA GCGTGGCGTT ATCCCGCACG CCCATGATTT  
2701 GCGCCATCAT CAAGCCGACA ACGCCTGCAA CGTGATAGCA ATAGCGCAGC  
2751 GTATCATCCA GTTGGCTGTA TTGCGCTTCG CGTACATCCA TGGCGAAGCC  
2801 TTCCAGATGA TCAAACGCGT AAGCCGGGGC GATATCATGA GCCATAGCCA  
2851 CTTCCTGAAA AGCCGCAAAC GCCGGTTCGT GCATCTGCGA TCCTGCATAG  
2901 GCCTGGCGCG TTTTCATCTC AAGTTGCATC AGACGTTGTT CGGGCGTTTG  
2951 TAAGGCAGGC TGCCGGGCCT GAAAGCCCAG CGTCTGATCG TCAATAACAT  
3001 CGTCACAATG GCGGCACCAG GCGTAGAGCA TCAGTACGCT GCGCCGGGTT  
3051 TTTGCATCAA ATAACTTTGA GGCTGTCGCA AAACTTTTTCG AGCCAACTGC  
3101 CATCGTTTTG ACCGCATGAT TGAGTAACGA CGGATTATTC ATATCAGATC  
3151 CTCCAGCATC AAACCTGCTG TCGCTTTTGC CGAGCCGATG ACGCCAGGAA  
3201 TGCTTGCGCC GGGATGCGTG CCTGCGCCGA CCAGGTAGAG ATTAGTAATG  
3251 GTTTTATCGC GGTTATGCGG CCGAAACCAG GCGCTCTGGG TAAGAACGGG  
3301 CTCCACAGAA AAGGCTGAGC CATGATAGGC ATTAAGCTGG TCGCGAAAAA  
3351 CAAACGGCGT AAACATCCGG TGCGTGACCA GCTGACTCCG TAAGCCAGGC  
3401 ATGTAATGCT GCTCAAGGTA CGCAAAAATA CGGTGCGGTA GTTTTGGCCC  
3451 CTCAACCGTC CAGTCGAGGT TCGCGGTGCC TAAATGCGGC ACCGGCGCCA  
3501 ACACATAGTA ACTGCCGCAA CCTTCAGGCG CCAGTGACGA ATCCGTGACA  
3551 CAGGGCGCGT GCAGATAAAG TGAGAAGTCC TCTGCGAGGC CATCATGATT  
3601 AAAAATTTTC TCAATCAGCT CGCGGTAACG CGGGCCGAAA CAAACCGTGT  
3651 GATGCGCGAG CTGATCATGA TGGTGATTCA AACCAAAATA GAGCACAAAC  
3701 AGAGAGTTAC TCATGCGCTT AGTCTGCAGT TTGTTGGACT GCTTAACCGC  
3751 GGCAGGGTGC TGGCTTAACA GGTGCGGATA GGTATGAACC ACATCTGCAT  
3801 TTGACGCGAC GGCTTGCGTC AGGAACCTGC GACCGTCCTC TAAATGCACG  
3851 GCTTCAATCT TGTTTCCTGT CGTTTCCATA TGGCTGACTC TGGCGTTTAA  
3901 CACGACTTCG CCACCCAGAT CCTGAAACAG CTTTATCATC CCCTGAACTA  
3951 ATGCGCCGGT GCCGCCACGC GGAAACCAGA CGCCCCACTC ACGCTCCAGC  
4001 GCGTGTATCA ACGTATAAAT GGATGAGGTG GCGAAGGGAT TGCCGCCAC  
4051 CAACAGCGAG TGGAAAGAAA ACGCCTGGCG CAGATGTTCA TCTTCGATGT  
4101 AACTGGCAAC CTTACTGTAA ACGCTTCTCC ATGCCTGCAG TTTCCGCCAGT  
4151 TGAGGTGCGG CGCGAAGCAT GTCTCTGAAC GATAAAAAAAG GGACAGTACC  
4201 GAGCTTTAGA TAGCCTTCTT TAAACACCGC GCGTGAATAG TCCAGAAACT  
4251 GACGATAACC TTCGACATCG CGGGGATTAA ACTGCTGAAT CTGCGCTTCG  
4301 AGCCGGGTTT GATCGTTATC GTAATTAAAG ACCTTCCCTG ACTCCCAACA

4351 CAGGCGGTAA AACGGCGTAA CCGGCAGCAG TTCGACATAC TCTTTTAACT  
4401 GTTTTCCTGC CAGTGCAAAC AGTTCTTCAA TGGCACTGGG ATCGGTGATA  
4451 ACCGTCGGGC CTGCATCAAA GGTAACCCC TGATCCTCGT AGACATAAGC  
4501 CCGACCGCCG GGTTTATCAC GTTGTTC AAG CAGTAAGACG GGGATCCCCG  
4551 CAGCTTGTAG ACGAATTGCC AGTGCCAGGC CACCGAAGCC TGCACCAATT  
4601 ACCGTAGTTG GTTTCATGTA GTCGCTCTTT AACGATGAGT CGTCATAATG  
4651 GCTTGCAATG CTGCTAATAC CGGAACAGGC GGCTTGCCGC TCAGAATACG  
4701 TACCTAGGCT ACGCTTGCTC TTTGCGGTTG ACTTGTAACA CATCTAAACC  
4751 ACTCTCATCC TTCGGAAACA AAGGATATGC ATACGCCTTG GCCAACCGAC  
4801 TGCCAGAACC CCCAGCTGAA ACCAGGTGAG CGAGCAACAA CCCACGAAGT  
4851 TCGTTGTTAC CAATTGCGAA CGTAGTGAGA GCAAACATGA TCAACTCTGA  
4901 GCTCGACAAT CTGTTACCCA AAAATCCTCT GCTCAGATTT GTTGGAAGCG  
4951 CAAAGAAGT ACTAAAGAAG TTGCGCATCT GCTCGATGCG AAGCGACATG  
5001 AGAAGCTCCA TACCGAAGT GTAGAAACCG ATTTGTCTTC GTGGCTCCGC  
5051 ACCCCAAAGG ATTTCCACG CTCTTCGGCT CGCCTCAATC TCGCCACCCT  
5101 CTTTCAAGCC TTCGGCCATG GCCGTGCGAA CACGCGGAGC TTTGCTAATA  
5151 CTGTTTACGA CGGAGTAGCC AGACGCAGGG TGGACCATGC CGGCTGCTGC  
5201 ACCGTACGCG ATGGTGCGTT GCGGGGCAAC CGGCGGGGTA CCGCCAGTG  
5251 GAATCCAAC CTGCTGACT TCCAAGATGT CTTCTTCGAC GATTTCCATA  
5301 CCCATCCGCT TCATACGACG ATACAATCGC CGTTTGAGTT CATCGAACGG  
5351 CACTTGTACG CGCGCGACGA GGCACGTCTC CTCGACGAAC ACCACATCCT  
5401 TGTCACGGG TAACACGTAA AGGAAAGACG GCACGCGCCA AACGCCCTCG  
5451 TCTTGTTCCT CTTTCATCGC CTCCGGATCG CTTTGACGAA AATCCATGAA  
5501 CACGGCCTTG TTCACGGGAA AACCGTGGTT CGGAATGCGC ACCTCAACGC  
5551 CATACGCAGT CTGCCAGCCC GCGGCGCAC CCTCTTCGTA GCTGAGCATG  
5601 TCGCGGTTGT GACCGGTGCC GGCAACGACG AGACGCGAAT TCAACGTGAA  
5651 TTGCTGGCCT CTGTTTGCCT CTTCTTCGAT CAACTTCTTC TCGCTTGCGG  
5701 TAATATCGGA ATCGCTAATG ATGGTGCCCT GAACTTCGGC TAACTCGTTC  
5751 TTTTCGACGT CACCGTGACG CACAAAATCT ACCAGGCCTG GTAAATACTT  
5801 GACGCCAGCC GCCGCGCACT CTTCAACAA ATGGTTCGCGA AGACGCCTGC  
5851 GGCACACTTG ACCGTAAGGT CGACCGAGTT CAGTTCCACT CGCAGGATCA  
5901 GAATCATCGA ACCAAAACAA TGCGTCGTCA TACTTATGAA GCAAGCAGTG  
5951 TTCGAGCCCT AGATCTTTGA ACTCGTCGAG CCATACTCCG TAGTTGTTCA  
6001 CGAACGGGGT GTCTGGTGCG ACGAGACCAA CAGAAAGACC CTTCTTCGCC  
6051 GTCTCCGCTG CGATCGCCAG ACCTGCGGGG CCCGCACCGA CAACGAGAAC  
6101 GTCGACCTTG TCGCGGTCGT TCAAAGCACT GAGGTACTCT TTGATTTGCT  
6151 TTTGCTCACT AAACACCTTG CGCTGTTGAA ACGCAATCCA TTCGCGATCA  
6201 TCCTTCATCG TCTCCGGCTT CATGTCCTGC GGCTTGCTCA GTGTGTCTTC  
6251 GGCTAAGATC TTCTCAAAGT CTAATGCGCT GCTTGTGATC GGTTTCGCAG  
6301 TGGGATTTCC GACCGGGGCG GGAATAGGCC CGTTTTTCGAC CGACTTGAAG  
6351 GCGTTGTTTT TGCCATCTTC GAGGATGAAA CCGCCCCACT TGCTCGAGTC  
6401 AAACCTGTTG TCGGCGAACG CAAAGTTTGC GAAGAACGAC CCCATGAAAG  
6451 GCAGAGCGGA TTTGACAAAG TTAACCTGCA TGTAGTTCGA AAACAACGCG  
6501 AACAGATTCA CCCCAGCGA AAGCAAGCCC ACCGGCTGGA TTCGCCAGCT  
6551 CAAAAAGCCA GCCCAGACGT CCTTGGAAG GTCGAAGAAC GTGTCAAAGA  
6601 ATTGACGCGT TCCATCGATA TCGAGCTGCA TAAGAGTCTC CATTCCAAAG  
6651 CACATGAAAG TGCGCATGCG CAAATCATTC TCCGGCCAAA TTGAGTTCCA  
6701 CACTAATGCC GCGGTGGCGT CCGCGTCGAA TTTACCGTTG TTCATTTGCG  
6751 CCGCCTCCGC CGCTTCAGG GCGCCGGTAA TATCCCCTCG CTTACCCGCC  
6801 TTAAGGGCTT CATCAAGCGT GCCTACGAGC GTTCTAACGC ATAACATCGT  
6851 CTTTGCAGCC ATAAATCCAG TGCTAGGATG GACCATGCCG GCGGTTCCAC  
6901 CGATGCCGAG CGTGCGTTGC GGAAACGTCG GCAACACGCC GCCCATGGGA  
6951 ATGAGACAAT ACTCCTCTTC GTGTACCTTG GTTACTTTCA CGCCCAAATA  
7001 ATCCAAACGC TCCTTCAACT TGAGCTTCAA GTCGTCAAAC TCTAAGCCAG  
7051 GTCGTGCCAC CAAGCTCGTT TCCTCGAGGA ACACCTCAGT TTCGAGAAA  
7101 GGCATGGCGT ACAAACCGT CCGCAACCTG TCGTTTCGCTC GCTTAAACTC  
7151 TGGGCTCAAG TGCTCGTCTC GCCAGTCCAT GAACAGCATC GTGTCCAACG  
7201 GAAAGTCGTG CTTCTCCACT GTGCACACGA TTCCGAAAGC GGCTTGATAT  
7251 CCCGGCGTAA AATCGCGATC AAAGTCCACC AGCTTACGAG AGTGCCAGT

7301 GCGTCCAAA ACCATCTTCG CATAGACCTT GCGTCCATCG CTCAAAGTCA  
7351 CCACCGAATG GTTCGGATCG CTGTTATCGC AGCTATCGAC CGCGGCGATA  
7401 CCAAACCTCA CGCCCTGCGT CACGCTGCGC GCGATGAGCT TCTGCTTGAG  
7451 CTTCCTCCGA TCCACCTGCG CGTACGCGCG GTCGAGCATC TTCCCCTCGG  
7501 CGTCGCCGTC GTCTATAATA ACTCGCGCCT GTTCCACAC CGCGCGATAG  
7551 CAATCATCGA ACCCGAGTGA TTTAAACTCG TCGCACCACA CCCCCTAATT  
7601 ATTCATCCAC GCGCGAGCG GCGACGGATC CATCAACGCC ACGCGCAATC  
7651 CGCGCTTGCT CGCCTCGTCC GCCGCCGTCA GCCCGCCGG TCCGCACCCG  
7701 ACAATCACCA AATCGTACGC CTCGCTCGCG CTCGTCCCC ATCGCACGTT  
7751 CGGCAGCGTT TCTGGAAGCG GCGTTCGCGA CTCTCGCTC TCCCCTCGAT  
7801 CGCCGCTGCT CAGCGGGTCC CACGAGGCGT CCAAGCCGTA CAGTCCCGC  
7851 CGGTCTCC CCGCGCTCGG CCGTCGCGTC ACCCGCGCG TCGCCGACGC  
7901 CCCCGCCCGC GTCGCGCCG GCGCGACGTC GCGCGCGCG GTTCCCCTCGT  
7951 CGCCTATAAG GCGGAGCTTG TCATCGTCAT CACCGGATCC AGAGCCCATG  
8001 CCTAGGGCGA TCGCCGCGAA ATGGCTCATG CAGCATCCTT AACTGACGGC  
8051 ACGGAGTTTT TTGTCAAACC AGGCCTGAAT AAAATGTTGA GTGGCGTGCC  
8101 CGTGTGGCA GGCCGAGAG AGATGCTCAC TGGCAAGCTG AAGATGTTGT  
8151 CTCAGACGTT CTTCAACCGC CCTCGGGCCT AACAGATTGA CCAGCGTCGA  
8201 TTTACCGCG TCCTGATTGC TATCCTTACC GGTGTCGGTC ATGCCATCGG  
8251 TCAAATCGTC CAGCAGTTGA AATGCCTGAC CAAGATCAAG TGAAAAACGA  
8301 TGCAGCAAT CACGCGCTTC GCTGGAGGCA TTCGCAACAA TCGAGCCAT  
8351 CTGCATGGAG GCACAAAACA GCGTGTGGT TTTAAAGTGA TTCGTATCA  
8401 AAATAGCTTC AGCGCTGCGC GGCTTATCCC CTTAGACAG ATCCTTGAAC  
8451 TGACCCTGAA CCAATCCTTG CATGCCGATG GCGTTTGACA GTTCAGAAAC  
8501 CGCCCATT TTTGCCAGCG GCGTGAGGCC ATCTGCATCG GCAATTACGC  
8551 CAAAGCTTT ACTCAGCAAG GCAACCGCCG CCAGTATTGC CACATGCTCT  
8601 CCGTAATGAG AATGAATGGT AGGGCGTCCG CGCCGCAGCT TCGCATCGTC  
8651 CATGCAGGGC ATATCGTCAA GGATCAGCGA AGCCGCGTGG ACCATTTCCA  
8701 CCGCACAGGC CAAATCCAGT AATCCGTCAT GGCTGACAGC GCAACCCAGA  
8751 TCGCGGGCGG TCAGCAACAG CAACATGGGG CGAATACGTT TTCCCCTGTC  
8801 CAGCGCACCT TCACGCATCG CGGCACCCAC AACATCCCCT TCTCCCTCCA  
8851 CGGGCAATAA CTGATCAAGG CGTCGATCAA TATCAGCCAG TAACTGCTCC  
8901 GCAGCATCGC GAGTGAGATG AACGTGTTTT TTTGCGCAGA CCGTCATTCG  
8951 GGCTGTCCTT ATAAACGGAT ACATTTACGG CAACGCGAAA GATGCGGTGC  
9001 CCTTCAAAAA GACGCTTAAT CTGCCATAAC ATGGTTGGCA GGCTTACCCG  
9051 TTATTTTACA TTTAGGGTTA CAGGTTTTTT TTGCTAAATC CACATCGTTA  
9101 ATACTAGTTG AGCTTGTGGA AAAGGTGGAA AATTCATAAA CCTCCGTCGG  
9151 ATTGGCAGAC CGTGCATCG TCCATTCCGA CAGCATCGCC AGTCACTATG  
9201 GCGTGCTGCT AGCGCTATAT GCGTTGATGC AATTTCTATG CGCACCCGTT  
9251 CTCGGAGCAC TGTCGACCG CTTTGGCCGC CGCCAGTCC TGCTCGCTTC  
9301 GCTACTTGGA GCCACTATCG ACTACGCGAT CATGGCGACC ACACCCGTCC  
9351 TGTGGATCCT CTACGCCGGA CGCATCGTGG CCGGCATCAC CGGCGCCACA  
9401 GGTGCGGTTG CTGGCGCCTA TATCGCCGAC ATCACCGATG GGGAAAGATCG  
9451 GGCTCGCCAC TTCGGGCTCA TGAGCGCTTG TTTCCGGCGTG GGTATGGTGG  
9501 CAGGCCCCGT GGCCGGGGGA CTGTTGGGCG CCATCTCCTT GCATGCACCA  
9551 TTCCTTGCGG CGGCGGTGCT CAACGGCCTC AACCTACTAC TGGGCTGCTT  
9601 CCTAATGCAG GAGTCGCATA AGGGAGAGCG TCGACCGATG CCCTTGAGAG  
9651 CCTTCAACCC AGTCAGCTCC TTCCGGTGGG CGCGGGGCAT GACTATCGTC  
9701 GCCGACTTA TGA CTGTCTT CTTTATCATG CAACTCGTAG GACAGGTGCC  
9751 GGCAGCGCTC TGGGTCATTT TCGGCGAGGA CCGCTTTCGC TGGAGCGCGA  
9801 CGATGATCGG CCTGTGCTT GCGGTATTTC GAATCTTGCA CGCCCTCGCT  
9851 CAAGCCTTCG TCACTGGTCC CGCCACCAA CGTTTCGGCG AGAAGCAGGC  
9901 CATTATCGCC GGCATGGCGG CCGACGCGCT GGGCTACGTC TTGCTGGCGT  
9951 TCGCGACGCG AGGCTGGATG GCCTTCCCA TTATGATTCT TCTCGCTTCC  
10001 GCGGCATCG GGATGCCCGC GTTGAGGCC ATGCTGTCCA GGCAGGTAGA  
10051 TGACGACCAT CAGGGACAGC TTCAAGGATC GCTCGCGGCT CTTACCAGCC  
10101 TAACTTCGAT CACTGGACCG CTGATCGTCA CGGCGATTTA TGCCGCTCG  
10151 GCGAGCACAT GGAACGGGTT GGCATGGATT GTAGGCGCCG CCCTATACCT

10201 TGTCTGCCTC CCCGCGTTGC GTCGCGGTGC ATGGAGCCGG GCCACCTCGA  
10251 CCTGAATGGA AGCCGGCGGC ACCTCGCTAA CGGATTCACC ACTCCAAGAA  
10301 TTGGAGCCAA TCAATTCCTG CGGAGAACTG TGAATGCGCA AACCAACCTT  
10351 TGGCAGAACA TATCCATCGC GTCCGCCATC TCCAGCAGCC GCACGCGGGC  
10401 CATCTCGGGC AGCGTTGGGT CCTGGCCACG GGTGCGCATG ATCGTGCTCC  
10451 TGTCGTTGAG GACCCGGCTA GGCTGGCGGG GTTGCCTTAC TGGTTAGCAG  
10501 AATGAATCAC CGATACGCGA GCGAACGTGA AGCGACTGCT GCTGCAAAAC  
10551 GTCTGCGACC TGAGCAACAA CATGAATGGT CTTCGGTTTC CGTGTTCGT  
10601 AAAGTCTGGA AACGCGGAAG TCCCCTACGT GCTGCTGAAG TTGCCCGCAA  
10651 CAGAGAGTGG AACCAACCGG TGATACCACG ATACTATGAC TGAGAGTCAA  
10701 CGCCATGAGC GGCCATCATT CTTATTCTGA GTTACAACAG TCCGCACCGC  
10751 TGTCGGTAGC CTCCTTCCGG TGGGCGCGGG GCATGACTAT CGTCGCGCA  
10801 CTTATGACTG TCTTCTTTAT CATGCAACTG GTAGGACAGG TGCCCGCAGC  
10851 GCCAACAGT CCCCCGGCCA CGGGGCCCTGC CACCATAACC ACGCCGAAAC  
10901 AAGCGCCCTG CACCATTATG TTCCGGATCT GCATCGCAGG ATGCTGTGG  
10951 CTACCCTGTG GAACACCTAC ATCTGTATTA ACGAAGCGCT AACCGTTTTT  
11001 ATCAGGCTCT GGGAGGCAGA ATAAATGATC ATATCGTCAA TTATTACCTC  
11051 CACGGGGAGA GCCTGAGCAA ACTGGCCTCA GGCATTTGAG AAGCACACGG  
11101 TCACACTGCT TCCGGTAGTC AATAAACCGG TAAACCAGCA ATAGACATAA  
11151 GCGGCTATTT AACGACCCTG CCCTGAACCG ACGACCGGGT CGAATTTGCT  
11201 TTCGAATTTT TGCCATTCAT CCGCTTATTA TCACTTATTC AGGCGTAGCA  
11251 CCAGGCGTTT AAGGGCACCA ATAAGTGCCT TAAAAAATT ACGCCCCGCC  
11301 CTGCCACTCA TCGCAGTACT GTTGTAAATC ATTAAGCATT CTGCCGACAT  
11351 GGAAGCCATC ACAGACGGCA TGATGAACCT GAATCGCCAG CGGCATCAGC  
11401 ACCTTGTCGC CTTGCGTATA ATATTTGCCC ATGGTGAAAA CGGGGGCGAA  
11451 GAAGTTGTCC ATATTGGCCA CGTTTAAATC AAAACTGGTG AAACCTCACCC  
11501 AGGGATTGGC TGAGACGAAA AACATATTCT CAATAAACCC TTTAGGGAAA  
11551 TAGGCCAGGT TTTACCGTA ACACGCCACA TCTTGCGAAT ATATGTGTAG  
11601 AAACCTGCCG AAATCGTCGT GGTATTCACT CCAGAGCGAT GAAAACGTTT  
11651 CAGTTTGCTC ATGGAAAACG GTGTAACAAG GGTGAACACT ATCCCATATC  
11701 ACCAGCTCAC CGTCTTTCAT TGCCATACG

## pLYCO II

1 GAATTCCGGA TGAGCATTCA TCAGGCGGGC AAGAATGTGA ATAAAGCCCG  
51 GATAAACTT GTGCTTATTT TTCTTTACGG TCTTTAAAAA GGCCGTAATA  
101 TCCAGCTGAA CGGTCTGGTT ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAATGC  
151 CTCAAAATGT TCTTTACGAT GCCATTGGGA TATATCAACG GTGGTATATC  
201 CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCCT TAGCTCCTGA AAATCTCGAT  
251 AACTCAAAA ATACGCCCGG TAGTGATCTT ATTTTATTAT GGTGAAAGTT  
301 GGAACCTCTT ACGTGCCGAT CAACGTCTCA TTTTCGCCAA AAGTTGGCCC  
351 AGGGCTTCCC GGTATCAACA GGGACACCAG GATTTATTTA TTCTGCGAAG  
401 TGATCTTCCG TCACAGGTAT TTATTCGGCG CAAAGTGCCT CGGGTGATGC  
451 TGCCAACCTA CTGATTTAGT GTATGATGGT GTTTTTGAGG TGCTCCAGTG  
501 GCTTCTGTTT CTATCAGCTG TCCCTCCTGT TCAGCTACTG ACGGGGTGGT  
551 GCGTAACGGC AAAAGCACCG CCGGACATCA GCGCTAGCGG AGTGTATACT  
601 GGCTTACTAT GTTGGCACTG ATGAGGGTGT CAGTGAAGTG CTTTATGTGG  
651 CAGGAGAAAA AAGGCTGCAC CGGTGCGTCA GCAGAATATG TGATACAGGA  
701 TATATTCGCG TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TACGCTCGGT CGTTCGACTG  
751 CGGCGAGCGG AAATGGCTTA CGAACGGGGC GGAGATTTCC TGGAAGATGC  
801 CAGGAAGATA CTTAACAGGG AAGTGAGAGG GCCGCGGCAA AGCCGTTTTT  
851 CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACAAGCATCA CGAAATCTGA CGCTCAAATC  
901 AGTGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT  
951 GGCGGCTCCC TCGTGCCTC TCCTGTTTCT GCCTTTTCGGT TTACCGGTGT  
1001 CATTCGCTG TTATGGCCGC GTTTGTCTCA TTCCACGCCT GACTACTCAGT  
1051 TCCGGGTAGG CAGTTCGCTC CAAGCTGGAC TGTATGCACG AACCCCCCGT  
1101 TCAGTCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC  
1151 CGGAAAGACA TGCAAAAAGCA CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAATTGATTT  
1201 AGAGGAGTTA GTCTTGAAGT CATGCGCCGG TTAAGGCTAA ACTGAAAGGA

1251 CAAGTTTTGG TGA CTGCGCT CCTCCAAGCC AGTTACCTCG GTTCAAAGAG  
1301 TTGGTAGCTC AGAGAACCTT CGAAAAACCG CCCTGCAAGG CGGTTTTTTC  
1351 GTTTTAGAG CAAGAGATTA CGCGCAGACC AAAACGATCT CAAGAAGATC  
1401 ATCTTATTAA TCAGATAAAA TATTTCTAGA TTTCAGTGCA ATTTATCTCT  
1451 TCAAATGTAG CACCTGAAGT CAGCCCCATA CGATATAAGT TGTAAATCTC  
1501 ATGTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG TTTATCACAG  
1551 TTAAATTGCT AACGCAGTCA GGCACCGTGT ATGAAATCTA ACAATGCGCT  
1601 CATCGTCATC CTCGGCACCG TCACCCTGGA TGCTGTAGGC ATAGGCTTGG  
1651 TTATGCCGGT ACTGCCGGGC CTCTTGCGGG ATCGAGCTCG TCTCTGTTAA  
1701 AATTGAATCC TTAAGCCTGC TGCCAGACGT TGCATCACGC CGTCAGGGGC  
1751 AAAGAAGGTT GTGTTTCTTT TGGCTTCCTC TATGCGCCGC CCCTGTCAAA  
1801 ACTTCAGCGC ACGCTCCGGG AAAGACATGG CGCTAGAGCG GGCAGTGCCA  
1851 GAGATGCGCA GGGCGGGGAG GATGAGCCCG CATCCGGGAA GTAAGGGCCT  
1901 GACCAGAGGC GGCAGCAGC AGCGTTAATT TTTCCGGCGT GGTCTGTGAC  
1951 TGCCGCTGAT CCCAGGCTTG CTGACCGGCC TGTTCAACTT TGACACCTAT  
2001 TTTCCGGTAA ACCTGCTTCG CCGTAGCGAT TGCCAGGCG GAACGCAGGG  
2051 GCAACCCTGC CAGGCCGGCT GTGGCAGACA AATAGTAAGG TTCTGCTTCC  
2101 TGCACCAAAC GACGGGCGAT ACGGCTCAGC GCCTGACGGT TTTAGGTGTC  
2151 CGCATAATTC TCTTTGTTCA GACCTTCATG CTCCAGCCAG CTTGCCGGCA  
2201 GATAACAGCG GCCCGCATGC GCATCGTCCA CAATATCGCG AGCAATATTG  
2251 GTCAACTGAA ATGCCAGCCC AAGGTCACAG GCGCGGTCCA GCGTGGCGTT  
2301 ATCCCGCAGC CCCATGATTT GCGCCATCAT CAAGCCGACA ACGCCTGCAA  
2351 CGTGATAGCA ATAGCGCAGC GTATCATCCA GTTGCTGTGA TTGCGCTTCG  
2401 CGTACATCCA TGGCGAAGCC TTCCAGATGA TCAAACGCGT AAGCCGGGGC  
2451 GATATCATGA GCCATAGCCA CTTCTGAAA AGCCGCAAAC GCCGGTTTCGT  
2501 GCATCTGCGA TCCTGCATAG GCCTGGCGCG TTTTCATCTC AAGTTGCATC  
2551 AGACGTTGTT CGGGCGTTTG TAAGGCAGGC TGCCGGGCCT GAAAGCCCAG  
2601 CGTCTGATCG TCAATAACAT CGTCACAATG GCGGCACCAG GCGTAGAGCA  
2651 TCAGTACGCT GCGCCGGGTT TTTGCATCAA ATAACTTTGA GGCTGTGCGA  
2701 AAACTTTTCG AGCCAACTGC CATCGTTTCG ACCGCATGAT TGAGTAACGA  
2751 CGGATTATTC ATATCAGATC CTCCAGCATC AAACCTGCTG TCGCTTTTGC  
2801 CGAGCCGATG ACGCCAGGAA TGCCTGCGCC GGGATGCGTG CCTGCGCCGA  
2851 CCAGGTAGAG ATTAGTAATG GTTTTATCGC GGTTATGCGG CCGAAACCAG  
2901 GCGCTCTGGG TAAGAACGGG CTCCACAGAA AAGGCTGAGC CATGATAGGC  
2951 ATTAAGCTGG TCGCGAAAAAT CAAACGGCGT AAACATCCGG TCGGTGACCA  
3001 GCTGACTCCG TAAGCCAGGC ATGTAATGCT GCTCAAGGTA CGCAAAAATA  
3051 CGGTGCGGTA GTTTTGGCCC CTCAACCGTC CAGTCGAGGT TCGCGGTGCC  
3101 TAAATGCGGC ACCGGCGCCA ACACATAGTA ACTGCCGCAA CCTTCAGGCG  
3151 CCAGTGACGA ATCCGTGACA CAGGGCGCGT GCAGATAAAG TGAGAAGTCC  
3201 TCTGCGAGGC CATCATGATT AAAAATTTTCG TCAATCAGCT CGCGGTAACG  
3251 CGGGCCGAAA CAAACCGTGT GATGCGCGAG CTGATCATGA TGGTGAATCA  
3301 AACCAAAATA GAGCACAAC AGAGAGTTAC TCATGCGCTT AGTCTGCAGT  
3351 TTGTTGGACT GCTTAACCGC GGCAGGGTGC TGGCTTAACA GGTGCGGATA  
3401 GGTATGAACC ACATCTGCAT TTGACGCGAC GGCTTGCCTC AGGAACCTGC  
3451 GACCGTCTCT TAAATGCACG GCTTCAATCT TGTTTCTGT CGTTTCCATA  
3501 TGGCTGACTC TGGCGTTTAA CACGACTTCG CCACCCAGAT CCTGAAACAG  
3551 CTTTATCATC CCCTGAACTA ATGCGCCGGT GCCGCCACGC GGAAACCAGA  
3601 CGCCCCACTC ACGCTCCAGC GCGTGTATCA ACGTATAAAT GGATGAGGTG  
3651 GCGAAGGGAT TGCCGCCAC CAACAGCGAG TGGAAAGAAA ACGCCTGGCG  
3701 CAGATGTTCA TCTTCGATGT AACTGGCAAC CTTACTGTAA ACGCTTCTCC  
3751 ATGCCTGCAG TTTCCGCCAGT TGAGGTGCGG CGCGAAGCAT GTCTCTGAAC  
3801 GATAAAAAAG GGACAGTACC GAGCTTTAGA TAGCCTTCTT TAAACACCGC  
3851 GCGTGAATAG TCCAGAAACT GACGATAACC TTCGACATCG CGGGGATTAA  
3901 ACTGCTGAAT CTGCGCTTCG AGCCGGGTTT GATCGTTATC GTAATTAAG  
3951 ACCTTCCCTG ACTCCAACA CAGGCGGTAA AACGGCGTAA CCGGCAGCAG  
4001 TTCGACATAC TCTTTTAACT GTTTTCTTGC CAGTGCAAAC AGTTCTTCAA  
4051 TGGCACTGGG ATCGGTGATA ACCGTCGGGC CTGCATCAA GGTAAACCCC  
4101 TGATCCTCGT AGACATAAGC CCGACCGCC GGTATTATCAC GTTGTTC AAG

4151 CAGTAAGACG GGGATCCCCG CAGCTTGTAG ACGAATTGCC AGTGCCAGGC  
4201 CACCGAAGCC TGCACCAATT ACCGTAGTTG GTTTCATGTA GTCGCTCTTT  
4251 AACGATGAGT CGTCATAATG GCTTGCAATG CTGCTAATAC CGGAACAGGC  
4301 GGCTTGCCGC TCAGAATACG TACCTAGGGC GATCGCCGCG AAATGGCTCA  
4351 TGCAGCATCC TTAAGTACG GCAGCGAGTT TTTTGTCAA CCAGGCCTGA  
4401 ATAAAATGTT GAGTGGCGTG CCCGTGTTGG CAGGCCGCGAG AGAGATGCTC  
4451 ACTGGCAAGC TGAAGATGTT GTCTCAGACG TTCTTCAACC GCCCTCGGGC  
4501 CTAACAGATT GACCAGCGTC GATTTACCGG CGTCCTGATT GCTATCCTTA  
4551 CCGGTGTCGG TCATGCCATC GGTCAAATCG TCCAGCAGTT GAAATGCCTG  
4601 ACCAAGATCA AGTGAAAAAC GATGCAGGCA ATCACGCGCT TCGCTGGAGG  
4651 CATTGCAAC AATCGAGGCC ATCTGCATGG AGGCACAAAA CAGCGTGCTG  
4701 GTTTTAAAGT GATTGTCAT CAAAATAGCT TCAGCGCTGC GCGGCTTATC  
4751 CCCTTCAGAC AGATCCTTGA ACTGACCCTG AACCAATCCT TGCATGCCGA  
4801 TGGCGTTTGA CAGTTCAGAA ACCGCCCCGAT TTTTGGCCAG CGGCGTGAGG  
4851 CCATGTCAT CGGCAATTAC GCCAAAGGCT TTAATCAGCA AGGCAACCGC  
4901 CGCCAGTATT GCCACATGCT CTCCGTAATG AGAATGAATG GTAGGGCGTC  
4951 CGCGCCGCGAG CTTCGCATCG TCCATGCAGG GCATATCGTC AAGGATCAGC  
5001 GAAGCCGCGT GGACCATTTC CACCGCACAG GCCAAATCCA GTAATCCGTC  
5051 ATGGCTGACA GCGCAACCCA GATCGCGGGC GGTGAGCAAC AGCAACATGG  
5101 GGCGAATACG TTTTCCCGGT GCCAGCGCAC CTTCACGCAT CGCGGCACCC  
5151 ACAACATCCC GTTCTCCCTC CACGGGCAAT AACTGATCAA GCGTTCGATC  
5201 AATATCAGCC AGTAACTGCT CCGCAGCATC GCGAGTGAGA TGAACGTGTT  
5251 TTTTTCGCA GACCGTCATT CGGGCTGTCC TTATAAACGG ATACATTTAC  
5301 GGCAACGCGA AAGATGCGGT GCCCTTCAA AAGACGCTTA ATCTGCCATA  
5351 ACATGGTTGG CAGGCTTACC CGTTATTTTA CATTTAGGGT TACAGGTTTT  
5401 TTTTGCTAAA TCCACATCGT TAATACTAGT TGAGCTTGTG GAAAAGGTGG  
5451 AAAATTCATA AACCTCCGTC GGATTGGCAG ACCGTGCGAT CGTCCATTCC  
5501 GACAGCATCG CCAGTCACTA TGGCGTGCTG CTAGCGCTAT ATGCGTTGAT  
5551 GCAATTTCTA TGCGCACCCG TTCTCGGAGC ACTGTCCGAC CGCTTTGGCC  
5601 GCCGCCAGT CCTGCTCGCT TCGCTACTTG GAGCCACTAT CGACTACGCG  
5651 ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC CTCTACGCCG GACGCATCGT  
5701 GGCCGGCATC ACCGGCGCCA CAGGTGCGGT TGCTGGCGCC TATATCGCCG  
5751 ACATCACCGA TGGGGAAGAT CGGGCTCGCC ACTTCGGGCT CATGAGCGCT  
5801 TGTTCGGCG TGGGTATGGT GGCAGGCCCC GTGGCCGGGG GACTGTTGGG  
5851 CGCCATCTCC TTGCATGCAC CATTCCCTTG GCGGGCGGTG CTCAACGGCC  
5901 TCAACCTACT ACTGGGCTGC TTCCTAATGC AGGAGTCGCA TAAGGGAGAG  
5951 CGTCGACCGA TGCCCTTGAG AGCCTTCAAC CCAGTCAGCT CCTTCCGGTG  
6001 GGCGCGGGG ATGACTATCG TCGCCGCACT TATGACTGTC TTCTTTATCA  
6051 TGCAACTCGT AGGACAGGTG CCGGCAGCGC TCTGGGTCAT TTTGCGCGAG  
6101 GACCGCTTTC GCTGGAGCGC GACGATGATC GGCTGTGCG TTGCGGTATT  
6151 CGGAATCTTG CACGCCCTCG CTCAAGCCTT CGTCACTGGT CCCGCCACCA  
6201 AACGTTTCGG CGAGAAGCAG GCCATTATCG CCGGCATGGC GGCAGACGCG  
6251 CTGGGCTACG TCTTGCTGGC GTTCGCGACG CGAGGCTGGA TGGCCTTCCC  
6301 CATTATGATT CTTCTCGCTT CCGGCGGCAT CGGGATGCCC GCGTTGCAGG  
6351 CCATGCTGTC CAGGCAGGTA GATGACGACC ATCAGGGACA GCTTCAAGGA  
6401 TCGCTCGCGG CTCTTACCAG CTAACCTTCG ATCACTGGAC CGCTGATCGT  
6451 CACGGCGATT TATGCCGCTT CCGCGAGCAC ATGGAACGGG TTGGCATGGA  
6501 TTGTAGGCGC CGCCCTATAC CTTGTCTGCC TCCCCGCGTT GCGTCGCGGT  
6551 GCATGGAGCC GGGCCACCTC GACCTGAATG GAAGCCGGCG GCACCTCGCT  
6601 AACGGATTCA CCACTCCAAG AATTGGAGCC AATCAATTCT TGCGGAGAAC  
6651 TGTGAATGCG CAAACCAACC CTTGGCAGAA CATATCCATC GCGTCCGCCA  
6701 TCTCCAGCAG CCGCACGCGG CGCATCTCGG GCAGCGTTGG GTCCTGGCCA  
6751 CGGGTGCGCA TGATCGTGCT CCTGTGCTTG AGGACCCGGC TAGGCTGGCG  
6801 GGGTTGCCCTT ACTGGTTAGC AGAATGAATC ACCGATACGC GAGCGAACGT  
6851 GAAGCGACTG CTGCTGCAAA ACGTCTGCGA CCTGAGCAAC AACATGAATG  
6901 GTCTTCGGTT TCCGTGTTTC GTAAAGTCTG GAAACGCGGA AGTCCCCTAC  
6951 GTGCTGCTGA AGTTGCCCGC AACAGAGAGT GGAACCAACC GGTGATACCA  
7001 CGATACTATG ACTGAGAGTC AACGCCATGA GCGGCCTCAT TTCTTATTCT  
7051 GAGTTACAAC AGTCCGCACC GCTGTCCGGT AGCTCCTTCC GGTGGGCGCG

7101 GGGCATGACT ATCGTCGCCG CACTTATGAC TGTCTTCTTT ATCATGCAAC  
7151 TCGTAGGACA GGTGCCGGCA GCGCCCAACA GTCCCCGGC CACGGGGCCT  
7201 GCCACCATAC CCACGCCGAA ACAAGCGCCC TGCACCATTA TGTTCCGGAT  
7251 CTGCATCGCA GGATGCTGCT GGCTACCCTG TGGAACACCT ACATCTGTAT  
7301 TAACGAAGCG CTAACCGTTT TTATCAGGCT CTGGGAGGCA GAATAAATGA  
7351 TCATATCGTC AATTATTACC TCCACGGGGA GAGCCTGAGC AACTTGGCCT  
7401 CAGGCATTTG AGAAGCACAC GGTCACACTG CTTCCGGTAG TCAATAAACC  
7451 GGTAACCAG CAATAGACAT AAGCGGCTAT TTAACGACCC TGCCCTGAAC  
7501 CGACGCCGG GTCGAATTTG CTTTCGAATT TCTGCCATTC ATCCGCTTAT  
7551 TATCACTTAT TCAGGCGTAG CACCAGGCGT TTAAGGGCAC CAATAACTGC  
7601 CTTAAAAAAA TTACGCCCCG CCCTGCCACT CATCGCAGTA CTGTTGTAAT  
7651 TCATTAAGCA TTCTGCCGAC ATGGAAGCCA TCACAGACGG CATGATGAAC  
7701 CTGAATCGCC AGCGGCATCA GCACCTTGTC GCCTTGCGTA TAATATTTGC  
7751 CCATGGTGAA AACGGGGGCG AAGAAGTTGT CCATATTGGC CACGTTTAAA  
7801 TCAAAACTGG TGAAACTCAC CCAGGGATTG GCTGAGACGA AAAACATAT  
7851 CTAATAAAC CCTTTAGGGA AATAGGCCAG GTTTTCACCG TAACACGCCA  
7901 CATCTTGCGA ATATATGTGT AGAAACTGCC GGAAATCGTC GTGGTATTCA  
7951 CTCCAGAGCG ATGAAAACGT TTCAGTTTGC TCATGGAAAA CGGTGTAACA  
8001 AGGGTGAACA CTATCCCATA TCACCAGCTC ACCGTCTTTC ATTGCCATAC  
8051 G

**pRUBI**

1 GAATTCGGGA TGAGCATTCA TCAGGCGGGC AAGAATGTGA ATAAAGGCCG  
51 GATAAAACTT GTGCTTATTT TTCTTTACGG TCTTTAAAAA GGCCGTAATA  
101 TCCAGCTGAA CGGTCTGGTT ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAATGC  
151 CTCAAAATGT TCTTTACGAT GCCATTGGGA TATATCAACG GTGGTATATC  
201 CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCCT TAGCTCCTGA AAATCTCGAT  
251 AACTCAAAAA ATACGCCCGG TAGTGATCTT ATTTCAATTAT GGTGAAAGTT  
301 GGAACCTCTT ACGTGCCGAT CAACGTCTCA TTTTCGCCAA AAGTTGGCCC  
351 AGGCTTCCC GGTATCAACA GGGACACCAG GATTTATTTA TTCTGCGAAG  
401 TGATCTTCCG TCACAGGTAT TTATTGCGCG CAAAGTGCCT CGGGTGATGC  
451 TGCCAACCTA CTGATTTAGT GTATGATGGT GTTTTTGAGG TGCTCCAGTG  
501 GCTTCTGTTT CTATCAGCTG TCCCTCCTGT TCAGCTACTG ACGGGGTGGT  
551 CCGTAACGGC AAAAGCACCG CCGGACATCA GCGCTAGCGG AGTGTATACT  
601 GGCTTACTAT GTTGGCACTG ATGAGGGTGT CAGTGAAGTG CTTCATGTGG  
651 CAGGAGAAAA AAGGCTGCAC CGGTGCCTCA GCAGAATATG TGATACAGGA  
701 TATATTCCGC TTCTCGCTC ACTGACTCGC TACGCTCGGT CGTTCGACTG  
751 CGGCGAGCGG AAATGGCTTA CGAACGGGGC GGAGATTTCC TGGAAGATGC  
801 CAGGAAGATA CTTAACAGGG AAGTGAGAGG GCCGCGCAA AGCCGTTTTT  
851 CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACAAGCATCA CGAAATCTGA CGCTCAAATC  
901 AGTGGTGGCG AAACCCGACA GGAATAAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT  
951 GGCGGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTTCT GCCTTTCGGT TTACCGGTGT  
1001 CATTCCGCTG TTATGGCCGC GTTTGTCTCA TTCCACGCCT GACTCAGT  
1051 TCCGGGTAGG CAGTTCGCTC CAAGCTGGAC TGTATGCACG AACCCCCCGT  
1101 TCAGTCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC  
1151 CGGAAAGACA TGCAAAAGCA CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAATTGATTT  
1201 AGAGGAGTTA GTCTTGAAGT CATGCGCCGG TTAAGGCTAA ACTGAAAGGA  
1251 CAAGTTTTGG TGAAGTGCCT CCTCCAAGCC AGTTACCTCG GTTCAAAGAG  
1301 TTGGTAGCTC AGAGAACCTT CGAAAAACCG CCCTGCAAGG CGGTTTTTTC  
1351 GTTTTCAGAG CAAGAGATTA CGCGCAGACC AAAACGATCT CAAGAAGATC  
1401 ATCTTATTAA TCAGATAAAA TATTTCTAGA TTTCAGTGCA ATTTATCTCT  
1451 TCAAATGTAG CACCTGAAGT CAGCCCCATA CGATATAAGT TGTAATTCTC  
1501 ATGTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG TTTATCACAG  
1551 TTAAATTGCT AACGCAGTCA GGCACCGTGT ATGAAATCTA ACAATGCGCT  
1601 CATCGTCATC CTCGGCACCG TCACCCTGGA TGCTGTAGGC ATAGGCTTGG  
1651 TTATGCCGGT ACTGCCGGG CTCTTGCGGG ATCGAGCTCG TCTCTGTAA  
1701 AATTGAATCC TTAAGCCTGC TGCCAGACGT CTCTACCGGA GAAATTATGT

1751 TGTGGATTTG GAATGCCCTG ATCGTTTTTCG TTACCGTGAT TGGCATGGAA  
1801 GTGATTGCTG CACTGGCACA CAAATACATC ATGCACGGCT GGGGTTGGGG  
1851 ATGGCATCTT TCACATCATG AACCGCGTAA AGGTGCGTTT GAAGTTAACG  
1901 ATCTTTATGC CGTGGTTTTT GCTGCATTAT CGATCCTGCT GATTTATCTG  
1951 GGCAGTACAG GAATGTGGCC GCTCCAGTGG ATTGGCGCAG GTATGACGGC  
2001 GTATGGATTA CTCTATTTTA TGGTGCACGA CGGGCTGGTG CATCAAACGT  
2051 GGCCATTCCG CTATATTTCA CGCAAGGGCT ACCTCAAACG GTTGTATATG  
2101 GCGCACCGTA TGCATCACGC CGTCAGGGGC AAAGAAGGTT GTGTTTCTTT  
2151 TGGCTTCCTC TATGCGCCGC CCCTGTCAA AACTCAGGCG ACGCTCCGGG  
2201 AAAGACATGG CGCTAGAGCG GGCAGTGCCA GAGATGCGCA GGGCGGGGAG  
2251 GATGAGCCCG CATCCGGGAA GTAAGGGCCT GACCAGAGGC GGCCAGCAGC  
2301 AGCGTTAATT TTTCCGGCGT GGTCTGTTGAC TGCCGCTGAT CCCAGGCTTG  
2351 CTGACCGGCC TGTTCAACTT TGACACCTAT TTTCCGGTAA ACCTGCTTCG  
2401 CCGTAGCGAT TGCCAGGCG GAACGCAGGG GCAACCCTGC CAGGCCGGCT  
2451 GTGGCAGACA AATAGTAAGG TTCTGCTTCC TGCACCAAAC GACGGGCGAT  
2501 ACGGCTCAGC GCCTGACGGT TTTGAGGTGC CGCATAATTC TCTTTGTTCA  
2551 GACCTTCATG CTCCAGCCAG CTTGCCGGCA GATAACAGCG GCCCGCATGC  
2601 GCATCGTCCA CAATATCGCG AGCAATATTG GTCAACTGAA ATGCCAGCCC  
2651 AAGGTCACAG GCGCGGTCCA GCGTGGCGTT ATCCCGCACG CCCATGATTT  
2701 GCGCCATCAT CAAGCCGACA ACGCCTGCAA CGTGATAGCA ATAGCGCAGC  
2751 GTATCATCCA GTTGCTGTA TTGCGCTTCG CGTACATCCA TGGCGAAGCC  
2801 TTCCAGATGA TCAAACGCGT AAGCCGGGGC GATATCATGA GCCATAGCCA  
2851 CTTCCTGAAA AGCCGCAAAC GCCGGTTTCGT GCATCTGCGA TCCTGCATAG  
2901 GCCTGGCGCG TTTTCATCTC AAGTTGCATC AGACGTTGTT CGGGCGTTTG  
2951 TAAGGCAGGC TGCCGGGCCT GAAAGCCCAG CGTCTGATCG TCAATAACAT  
3001 CGTCACAATG GCGGCACCAG GCGTAGAGCA TCAGTACGCT GCGCCGGGTT  
3051 TTTGCATCAA ATAACCTTTGA GGCTGTGCGA AAACTTTTTCG AGCCAACCTGC  
3101 CATCGTTTTCG ACCGCATGAT TGAGTAACGA CGGATTATTC ATATCAGATC  
3151 CTCCAGCATC AAACCTGCTG TCGCTTTTTGC CGAGCCGATG ACGCCAGGAA  
3201 TGCCTGCGCC GGGATGCGTG CCTGCGCCGA CCAGGTAGAG ATTAGTAATG  
3251 GTTTTATCGC GGTATGCGG CCGAAACCAG GCGCTCTGGG TAAGAACGGG  
3301 CTCCACAGAA AAGGCTGAGC CATGATAGGC ATTAAGCTGG TCGCGAAAAAT  
3351 CAAACGGCGT AAACATCCGG TGCGTGACCA GCTGACTCCG TAAGCCAGGC  
3401 ATGTAATGCT GCTCAAAGTA CGCAAAAATA CGGTGCGGTA GTTTTGGCCC  
3451 CTCAACCGTC CAGTCGAGGT TCGCGGTGCC TAAATGCGGC ACCGGCGCCA  
3501 ACACATAGTA ACTGCCGCAA CCTTCAGGCG CCAGTGACGA ATCCGTGACA  
3551 CAGGGCGCGT GCAGATAAAG TGAGAAGTCC TCTGCGAGGC CATCATGATT  
3601 AAAAATTTTCG TCAATCAGCT CGCGGTAACG CGGGCCGAAA CAAACCGTGT  
3651 GATGCGCGAG CTGATCATGA TGGTGATTCA AACCAAAAATA GAGCACAAAC  
3701 AGAGAGTTAC TCATGCGCTT AGTCTGCAGT TTGTTGGACT GCTTAAACCGC  
3751 GGCAGGGTGC TGGCTTAACA GGTGCGGATA GGTATGAACC ACATCTGCAT  
3801 TTGACGCGAC GGCTTGCGTC AGGAACCTGC GACCGTCCTC TAAATGCACG  
3851 GCTTCAATCT TGTTTCCTGT CGTTTCCATA TGGCTGACTC TGGCGTTTAA  
3901 CACGACTTCG CCACCCAGAT CCTGAAACAG CTTTATCATC CCCTGAACTA  
3951 ATGCGCCGGT GCCGCCACGC GGAAACCAGA CGCCCCACTC ACGCTCCAGC  
4001 GCGTGTATCA ACGTATAAAT GGATGAGGTG GCGAAGGGAT TGCCGCCAC  
4051 CAACAGCGAG TGGAAAGAAA ACGCCTGGCG CAGATGTTCA TCTTCGATGT  
4101 AACTGGCAAC CTTACTGTAA ACGCTTCTCC ATGCCTGCAG TTTTCGCCAGT  
4151 TGAGGTGCGG CGCGAAGCAT GTCTCTGAAC GATAAAAAAG GGACAGTACC  
4201 GAGCTTTAGA TAGCCTTCTT TAAACACCGC GCGTGAATAG TCCAGAAACT  
4251 GACGATAACC TTCGACATCG CGGGGATTAA ACTGCTGAAT CTGCGCTTCG  
4301 AGCCGGGTTT GATCGTTATC GTAATTAAG ACCTTCCCTG ACTCCCAACA  
4351 CAGGCGGTAA AACGGCGTAA CCGGCAGCAG TTCGACATAC TCTTTTAACT  
4401 GTTTTCCTGC CAGTGCAAAC AGTTCTTCAA TGGCACTGGG ATCGGTGATA  
4451 ACCGTCGGGC CTGCATCAAA GGTAAACCCC TGATCCTCGT AGACATAAGC  
4501 CCGACCGCCG GGTTTATCAC GTTGTTCAAG CAGTAAGACG GGGATCCCCG  
4551 CAGCTTGTAG ACGAATTGCC AGTGCCAGGC CACCGAAGCC TGCACCAATT  
4601 ACCGTAGTTG GTTTCATGTA GTCGCTCTTT AACGATGAGT CGTCATAATG  
4651 GCTTGCAATG CTGCTAATAC CGGAACAGGC GGCTTGCCGC TCAGAATACG



4701 TATTAAGATC TGGTGCTGAA CGCCTTCTCC ACCACCTCCA CCACCGCCAT  
4751 GTCGGCGCCG CTCGAGTTGG CGGACACGAA GGC GGCGGCG TCGCTGGCCA  
4801 CGTCCGCGGC GGC GGCGGGCG GCGGCGGCGG CGGAGCGCGC GGCGGGCTCC  
4851 ACTGCGTCCT TGCGCTCCTT GAGCGACATT GTGTCTGGGT AGTAGCCGCC  
4901 TCCCAGTGTG GGC GCCAGTC CCGACAGCAT CACCACCAGG CCGGGGATGC  
4951 CCAGCTGCAG CAGGCTGGCG CGAGCCTGGT TGGAGCTCTT CCAGAACAGC  
5001 GTCAGGCCAA ACACAATCAG CTGCGGCAGC GACAGGCGTG TGGACAGGAA  
5051 GCCGTGCCAG TGAAGTCAC TGAGGCTGAA GAACGCCCTG AAGAACTCCC  
5101 GGATCTGCGG CAGGTTGAGC TTGAGCAGCA CGTCCATGCC AAAGGTGAAG  
5151 AAGGCGCGCT GCCGCACGCG CTCCAGCGGC CAGGTGGCGG CCCACACGGC  
5201 GGCGGCCATG GACTCCGCCT CCGCCTCGCT GGAGGGGCGC AGCGGGGCGC  
5251 CTGACTCGCT GGCCTTGTCG GCGGGGCGAC TGAGCTGATC CACAATGGTG  
5301 TCGGCAACCG TGGGCGCCGC GCCATCATG CGGCTGATCA TGAAGCCCGT  
5351 GGAGGGATGC ACCATGCCGG CTGTGCCGCC AATGGCCAGC ACAGCTGTG  
5401 GGTGTTTTGGG CAGCAGCCCG CCCATGGGGA TGAGGCAGTA CTCCTCCTCC  
5451 AGCACGTTGG TCACCTGAT CCCAGGTGC TGCAGCCGCG CCTGCAGCGC  
5501 GTCCTTGAGC TCGGGGAAGT CCACCGCGGG CCGCGACACC AGGCTGGTCT  
5551 CCTCCAGGAA CACCAGGTTT TTGGTGAAGG GCATGGCGTA CAGGAAGGTG  
5601 GGCAGCGCGG TGTTGGCTGC GCGCATGGCC TCCAGCCCCG GCGCCTGCGT  
5651 GTGGTCGTCG CGCCAGTCCA TGAACAGCAT GGTGTCCAGC GCAAACGGGT  
5701 GAGACTCAAC CTCCGCCACA ATGCCGTACG CGCCCTGGAA GCCCGGGTCG  
5751 AACTTCTTGT CGTACTGCAC CAGGCGGCGC GAGTGGCCGG TGGCGTCCAG  
5801 GACCAGGCTG CCGCGGATCT CGCGGCCGTC CGCCAGCTTG ACGGCGCTGC  
5851 AGCCGCCGCC GTGACTCACG CCCGACACCT TGGCGTCAAG GAACGTCACG  
5901 CCCGAGGCGA CGCAGCGCTC CAGCAGGATG CGCTTCAGCT TGGGCCGGTC  
5951 CACGCGGCCG AAGGGGCGGT TCAGGAACTT CTCGCCGTCG GCCTCGCTGT  
6001 TGAGCCAGAC CTTGGCCTTG GGCCAGATGA CGTGCAGGCA GTCCTCCAGC  
6051 CCCATCGCCT GGAACTCATC GAGCCAGACA CCATAGTTGT TGGGCCAGTG  
6101 GGCCAGCGGC TCGGGGTCGA CAACGCAAAC TGAGAAGCCC GCGGCAGCGA  
6151 CGCGGGAGGC CACCGCGACA CCAGCCGGGC CCGCGCCAGC CACCACCAGG  
6201 TCAACATAGT CTACCTCGTT TAAGTCATGC GGCTGAAGCC TAACGGTCTC  
6251 AGAGGTGGGC CATTTCCTCG TCTCGCGGTA GAAGTGCCCA ACGGGGCCAG  
6301 GCGGAATAGG ATACGGCCCC GACGGAAATG CGTCCTTCTG ACCCACGAGA  
6351 ATCAGATCAT AATGCGGTTG CATAGCCGCT CCCACTTAAG ACAGGCTGAC  
6401 CGGTGCACAT AACCTGCTCA ATGATATCGG CAGCGGCCAT GGTGCCCCCT  
6451 GCCAAACGAA GGGCTGTCTG GATTTTCGCC ATGCGCTGCT GAAAGTCGAC  
6501 GTTGGTCAGC AATGAACGCA TCTGACGAGC CAAAGCATGG CTGGTGGTAA  
6551 AGCGGGAAGC ACGCTTGCCG ATGCCGTGAT AAACGATGCG TGACGCGACG  
6601 CCGGGCTGAT CAAAGGCCAG CGGAAGCGCT AAAAGGGGCG TCCGGTAATT  
6651 AATCGCGTCC AGTACCGTAT TCATGCCGCC GTGGGTGATC GCCAGCTGCG  
6701 CCTGAGACAG CGCGGCTGAC TGATCGGCAA AATCCACCAC CTGTGTATGA  
6751 CGGCTTCGCG CCAGCTCTTC AACTGAGAG TCCGTAAGAC GACCACAGTG  
6801 GGCTAACAGG AGCTGACCGT CAATTTCTTC ACAGGCTTTC ACTATCGTTT  
6851 TAAACAGCCC ATAACGGTGT CCCTGAAGCG TGCCCAGCGA GGCGAAAATC  
6901 CGGGGTTTTT CTGAGGATGT AAAATAACGG GATGAAGACG TTGACGGTGC  
6951 GTGCGTTTTG CGCAGAGGCC CGACGGCATG AAAACAAGCC GGTAACGCTT  
7001 TGCGGGGAAA ATCCAGTTCA GGAACAAGCT GGCTGATTTG CGCCAGTGGC  
7051 GAAAAACACT GGTGAAGCTT TTGCCGGGGG GCTAAGCCCA TTCTGTGGCT  
7101 GTGTTCCGGCA ATGACACGGT CATGACGACG CATTAGCCAG TCATAAATTT  
7151 TTTCACTGGC GGCATAACGT TCGCGAGCCG CGTCGCTGGT CCCGTATTCG  
7201 AAAGGCATAA CCGCCAGGGG CATATCCGGT TCACGATTGA GAGGCAGCGC  
7251 GCAGGCGACA GAGATAAACG GCAGTCCCAG TGCTTCAGCA ACGAGCGCGC  
7301 CTGCCGGTTC CATTTGATCA ACAATGACGC CATCGACGGC CAGATCGTTA  
7351 AATGCCTGGG GGAGTTCGCG GCACAGCATA TCGGTGGTGC GCGCCATTTT  
7401 ATTGATGAGC TTCAGCATTG ACGGCCCCAG AGGATGAGCC GCCAGGTGTA  
7451 GCACGCGCGT TAACGCGCCG GGGGGATGGC TGTCTGTCCC GACGGAATGA  
7501 AATCCAATGG TTTGCTATC GATCAAGTGT TTAATATCGT ATTGCTGAAT  
7551 AAAGTCACCC GATGACCGCG CGCGACCAGT TCCTGAGCGA GATTCTGTAA

7601 TGCGCGAACA TGGCTGTAAA AAGGCGGTGC GATCGCCGCG AAATGGCTCA  
7651 TGCAGCATCC TTAAGTACG GCAGCGAGTT TTTTGTCAA CCAGGCCTGA  
7701 ATAAAATGTT GAGTGGCGTG CCCGTGTTGG CAGGCCGCAG AGAGATGCTC  
7751 ACTGGCAAGC TGAAGATGTT GTCTCAGACG TTCTTCAACC GCCCTCGGGC  
7801 CTAACAGATT GACCAGCGTC GATTTACCGG CGTCTGATT GCTATCCTTA  
7851 CCGGTGTCGG TCATGCCATC GGTCAAATCG TCCAGCAGTT GAAATGCCTG  
7901 ACCAAGATCA AGTGA AAAAC GATGCAGGCA ATCACGCGCT TCGCTGGAGG  
7951 CATTCGCAAC AATCGAGGCC ATCTGCATGG AGGCACAAA CAGCGTGCTG  
8001 GTTTTAAAGT GATTCGTCAT CAAAATAGCT TCAGCGCTGC GCGGCTTATC  
8051 CCCTTCAGAG AGATCCTTGA ACTGACCCTG AACCAATCCT TGCATGCCGA  
8101 TGCGGTTTGA CAGTTCAGAA ACCGCCCGAT TTTTGTCCAG CGGCGTGAGG  
8151 CCATCTGCAT CGGCAATTAC GCCAAAGGCT TTACTCAGCA AGGCAACCGC  
8201 CGCCAGTATT GCCACATGCT CTCCGTAATG AGAATGAATG GTAGGGCGTC  
8251 CGCGCCGCAG CTTGCGATCG TCCATGCAGG GCATATCGTC AAGGATCAGC  
8301 GAAGCCGCGT GGACCATTTT CACCGCACAG GCCAAATCCA GTAATCCGTC  
8351 ATGGCTGACA GCGCAACCCA GATCGCGGGC GGTGAGCAAC AGCAACATGG  
8401 GCGAATACG TTTTCCCGGT GCCAGCGCAC CTTACGCAT CGCGGCACCC  
8451 ACAACATCCC GTTCTCCCTC CACGGGCAAT AACTGATCAA GCGCTCGATC  
8501 AATATCAGCC AGTAACTGCT CCGCAGCATC GCGAGTGAGA TGAACGTGTT  
8551 TTTTGTGCGA GACCGTCATT CGGGCTGTCC TTATAAACGG ATACATTTAC  
8601 GGCAACGCGA AAGATGCGGT GCCCTTCAA AAGACGCTTA ATCTGCCATA  
8651 ACATGGTTGG CAGGCTTACC CGTTATTTTA CATTTAGGGT TACAGGTTTT  
8701 TTTTGCTAAA TCCACATCGT TAATACTAGT TGAGCTTGTG GAAAAGGTGG  
8751 AAAATTGATA AACCTCCGTC GGATTGGCAG ACCGTGCGAT CGTCCATTCC  
8801 GACAGCATCG CCAGTCACTA TGCGGTGCTG CTAGCGCTAT ATGCGTTGAT  
8851 GCAATTTCTA TGCGCACCCG TTCTCGGAGC ACTGTCCGAC CGCTTTGGCC  
8901 GCCGCCAGT CCTGCTCGCT TCGCTACTTG GAGCCACTAT CGACTACCGG  
8951 ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC CTCTACGCCG GACGCATCGT  
9001 GGCCGGCAGT ACCGGCGCCA CAGGTGCGGT TGCTGGCGCC TATATCGCCG  
9051 ACATCACCGA TGGGGAAGAT CGGGCTCGCC ACTTCGGGCT CATGAGCGCT  
9101 TGTTTCGGCG TGGGTATGGT GGCAGGCCCC GTGGCCGGGG GACTGTTGGG  
9151 CGCCATCTCC TTGCATGCAC CATTCTTTCG GCGGCGGGTG CTCAACGGCC  
9201 TCAACCTACT ACTGGGCTGC TTCCTAATGC AGGAGTCGCA TAAGGGAGAG  
9251 CGTCGACCGA TGCCCTTGGT AGCCTTCAAC CCAGTCAGCT CTTTCCGGTG  
9301 GGCGCGGGGC ATGACTATCG TCGCCGCACT TATGACTGTC TTCTTTATCA  
9351 TGCAACTCGT AGGACAGGTG CCGGCAGCGC TCTGGGTCAT TTTGCGCGAG  
9401 GACCGCTTTC GCTGGAGCGC GACGATGATC GGCCTGTGCG TTGCGGTATT  
9451 CGGAATCTTG CACGCCCTCG CTCAAGCCTT CGTCACTGGT CCCGCCACCA  
9501 AACGTTTCGG CGAGAAGCAG GCCATTATCG CCGGCATGGC GGCCGACCGC  
9551 CTGGGCTACG TCTTGCTGGC GTTCGCGACG CGAGGCTGGA TGGCCTTCCC  
9601 CATTATGATT CTTCTCGCTT CCGCGGCAT CCGGATGCCC GCGTTGCAGG  
9651 CCATGCTGTC CAGGCAGGTA GATGACGACC ATCAGGGACA GCTTCAAGGA  
9701 TCGCTCGCGG CTCTTACCAG CCTAACTTCG ATCACTGGAC CGCTGATCGT  
9751 CACGGCGATT TATGCCGCTT CCGCGAGCAC ATGGAACGGG TTGGCATGGA  
9801 TTGTAGGCGC CGCCCTATAC CTTGTCTGCC TCCCCGCGTT GCGTCGCGGT  
9851 GCATGGAGCC GGGCCACCTC GACCTGAATG GAAGCCGGCG GCACCTCGCT  
9901 AACGGATTCA CCACTCCAAG AATTGGAGCC AATCAATTCT TGCGGAGAAC  
9951 TGTGAATGCG CAAACCAACC CTTGGCAGAA CATATCCATC GCGTCCGCCA  
10001 TCTCCAGCAG CCGCACGCGG CGCATCTCGG GCAGCGTTGG GTCCTGGCCA  
10051 CGGGTGCGCA TGATCGTGCT CCTGTGCTTG AGGACCCGGC TAGGCTGGCG  
10101 GGGTTGCCTT ACTGGTTAGC AGAATGAATC ACCGATACGC GAGCGAACGT  
10151 GAAGCGACTG CTGCTGCAAA ACGTCTGCGA CCTGAGCAAC AACATGAATG  
10201 GTCTTCGGTT TCCGTGTTTC GTAAAGTCTG GAAACGCGGA AGTCCCCTAC  
10251 GTGCTGCTGA AGTTGCCCGC AACAGAGAGT GGAACCAACC GGTGATACCA  
10301 CGATACTATG ACTGAGAGTC AACGCCATGA GCGGCCTCAT TTCTTATTCT  
10351 GAGTTACAAC AGTCCGCACC GCTGTCCGGT AGCTCCTTCC GGTGGGCGCG  
10401 GGCATGACT ATCGTCGCCG CACTTATGAC TGTCTTCTTT ATCATGCAAC  
10451 TCGTAGGACA GGTGCCGCGA GCGCCCAACA GTCCCCGGC CACGGGGCCT  
10501 GCCACCATAC CCACGCCGAA ACAAGCGCCC TGCACCATTA TGTTCCGGAT

10551 CTGCATCGCA GGATGCTGCT GGCTACCCTG TGGAACACCT ACATCTGTAT  
10601 TAACGAAGCG CTAACCGTTT TTATCAGGCT CTGGGAGGCA GAATAAATGA  
10651 TCATATCGTC AATTATTACC TCCACGGGGA GAGCCTGAGC AAACCTGGCCT  
10701 CAGGCATTTG AGAAGCACAC GGTCACACTG CTTCCGGTAG TCAATAAACC  
10751 GGTAACCAG CAATAGACAT AAGCGGCTAT TTAACGACCC TGCCCTGAAC  
10801 CGACGACCGG GTCGAATTTG CTTTCGAATT TCTGCCATTC ATCCGCTTAT  
10851 TATCACTTAT TCAGGCGTAG CACCAGGCGT TTAAGGGCAC CAATAACTGC  
10901 CTTAAAAAAA TTACGCCCCG CCCTGCCACT CATCGCAGTA CTGTTGTAAT  
10951 TCATTAAGCA TTCTGCCGAC ATGGAAGCCA TCACAGACGG CATGATGAAC  
11001 CTGAATCGCC AGCGGCATCA GCACCTTGTC GCCTTGCGTA TAATATTTGC  
11051 CCATGGTGAA AACGGGGGCG AAGAAGTTGT CCATATTGGC CACGTTTAAA  
11101 TCAAAACTGG TGAAACTCAC CCAGGGATTG GCTGAGACGA AAAACATATT  
11151 CTCAATAAAC CCTTTAGGGA AATAGGCCAG GTTTTCACCG TAACACGCCA  
11201 CATCTTGCGA ATATATGTGT AGAAACTGCC GGAAATCGTC GTGGTATTCA  
11251 CTCCAGAGCG ATGAAAACGT TTCAGTTTGC TCATGGAAAA CGGTGTAACA  
11301 AGGGTGAACA CTATCCCATA TCACCAGCTC ACCGTCTTTC ATTGCCATAC  
11351 G

#### A.4. Primersequenzen

AmiRNAprec_p	GGTGTTGGGTCCGGTGTTTTTG
BKT_Seq3m	AGAGCCCGGTGTAAAGGAAT
BKT_Seq4p	GCGTGTGGATCCGGACTT
BKT_Seq5p	TACCACTTCGACCTGCACTG
BKT_Seq6m	TGCTTCGTGAACTGCTTGAC
CHYB_Seq3m	ATGACCTGCGAGGTCTCC
CHYB_Seq4m	GTACATCTCCATGCCGAACA
CHYB_Seq5p	CTGCACAAGAGCCACCAC
CHYB_Seq6p	TCCACCACACCAACAAGTTC
CrBKT-fus01m	CTATCTAGAAGTGTGCGGGCACGGGCAGC
CrBKT-fus01p	TCTAGAGCTAGCATGGGCCCTGGGATACAAC
CrBKTpBAD_a1p	ATGGGCCCTGGGATACAACC
CrBKTpBAD_e1m	AGCCATCACGCCAACAGG
CrBKT-pBADa2p	ATGGGCCCTGGGATACAAC
CrBKT-pBADa3p	ATGGGCCCTGGGATACAA
CrBKT-pBADa4p	CTTATGGGCCCTGGGATAC
CrCHYB-fus01m	CTATCTAGACGAGGAGCCGGCGGCCTT
CrCHYB-fus01p	TCTAGAATGCTGGCTTCGCGTCCTG
CrCYCac00p	AGCTGGAAACCGACCTGTG
CrCYCac01p	CTTCTCAGTTTTCGTTGTCG
CrCYCac02m	GAATCATCGAGCCAGACAC
CrCYCac02p	ACTATGGTGTCTGGCTCGAT
CrCYCac02p2	GTGTCGGGCGTGAGTCAC
CrCYCac03p	ATGCTGTTTCATGGACTGGC
CrCYCac04p	CCACGGGCTTCATGATCAG
CrCYCac05p	CGTTCTTCAGCCTCAGTGAC
CrCYCd01p	GTGCCATTGTGAACAATA
CrCYCd02p	CTGATGCCGTGTGCTACTTC
CrCYCd03p	GGCGACCTCATGACCTTC
CrCYCd04p	CACCGGCTTCAGCGTCAG
CrCYCd06p	GTGCTCAAGGCGCTGGAG
CrCYCdsq05p	GACTTCTTCAACACCTTCTTC
CrCYP97A_e1m_Ndel	GGTGGACATATGCGTGCGGAGCCACCTCAG
CrCYP97A_e1m_Xbal	TGCTGGTCTAGATTAGGGCCTCAGGCTCATCGT
CrCYP97A5_a1p	GTAGXXATGCAGACACAACG
CrCYP97A5_a1p	GTAGXXATGCAGACACAACG
CrCYP97A5_e1m	GCATCCTGATTGTGAACAGC
CrCYP97A5_e3m	GTCATTCTGTTCCAGTACGTGT
CrCYP97A5_Seq_a1m	CAGGGGACGAGTCAACTTCT
CrCYP97C3_a2p	GCCACAACAGATATGATGCTCT
CrCYP97C3_a3p	ATGCTCTCCAACCGCACT
CrCYP97C3_Seq_a1m	CACTTGTACAGCGCCTTGAA
CrCYP97e1m	GTTACAGTCCACCACACGA
CrCYP97e2m	CACCGACACGATGGATCTAC)
CrLCYB Seq	CATGCGGCTGATCATGAAG
CrLCYE-ar01p	GCATTCTAGATGCCAGGTTGTATCTACG
CrLCYE-ar02p	GCAATCTAGAGCGGCCCTGAATCAAGAA
CrtZ_a1p	ATGTTGTGGATTTGGAATGCCCTG
CrtZ_AsiSI_m	GCGATCGCTACGTAATACTTCCCAGGATGCGGGCTCAT
CrtZ_AsiSI_p	GCGATCGCATGTTGTGGATTTGGAATGCCCTG

CrtZ_kein-Stop	ATACTTCCCGGATGCGGGCTCAT
CrtZ_NcoI	ACCATGGGTATGTTGTGGATTTGGAATGCCCTG
CrtZ_no_Prä	GAGGAATAATAAATGTTGTGGATTTGGAATGCCCTG
CrtZ_TAA-Stop	TTACTTCCCGGATGCGGGCTCAT
CYP97A e1m XbaI	TGCTGGTCTAGATTAGGGCCTCAGGCTCATCGT
CYP97A e1m XbaI	TGCTGGTCTAGATTAGGGCCTCAGGCTCATCGT
CYP97A5_Seq	TACGTGATGTCGATGGTGA
CYP97A5_Seq8p	CCCAACGAGGTGACTGAAAA
CYP97A6 1124p Seq	TGCTGCACTTCCTGTTG
CYP97A6 1124p Seq	TGCTGCACTTCCTGTTG
CYP97A6 484p Seq	AAGTCCTTCCTGGTGCTC
CYP97A6 484p Seq	AAGTCCTTCCTGGTGCTC
CYP97A6 a1p	CCGTTCAACAACAGCCAAATA
CYP97A6 a2p NdeI	CATATGTCACCGGCTCTTTTCAA
CYP97A6 d42Np NdeI	GGTGGACATATGACTGCCCGACCCTACGTG
CYP97A6 d42Np NdeI	GGTGGACATATGACTGCCCGACCCTACGTG
CYP97A6 e1m	ACTGGTGACACCTCCTGCTT
CYP97A6 e2m XbaI	TGCTGGTCTAGAGTGCAGTGTACTGCGGTGT
CYP97A6_1615p_Seq	GTGACATGTTTCGCCATCG
CYP97A6_538m_Seq	TCTCAGCTAGGATGCCCTTG
CYP97C3_Seq	CTCTTCTCGCAGCTGACTCT
CYP97C3_Seq3p	CTGGTGGAGGACGAGCTG
EuCrtZ-fus01m	CTATCTAGACTTCCCGGATGCGGGCTCAT
EuCrtZ-fus01p	TCTAGAATGTTGTGGATTTGGAATGCCCTG
LCYB pACCAR a1p	CAGATTTACGTATTAAGATCTGGTGCTGAACGCCTTCTC
LCYB pACCAR e1m	AATCTCCTCGTGGGTCAGAAGGACGCATTTT
M13-partial	GGATAACAATTTACACACAGG
OL_AvrII_a1p	CCTAGGCATGGGCTCTGGATCCGGTGTAT
OL_AvrII_a2p	CCTAGGCATGGGCTCTGGATCCG
OL_AvrII_a3p	CCTAGGAATAGGCGACGCGGGAAC
OL-PacI_a_p	TTAATTAATGGGCTCTGGATCCGGTGTAT
OL-PacI_b_p	TTAATTAATGGGCTCTGGAT
OL-SnaBI_m	TACGTACTACGCTTGCTCTTTGCGGTTGAC
OluLCY pBAD a1p	GCGCATCGACGCACGA
OluLCY pBAD a2p	CATCGACGCACGATGCT
OluLCY pBAD e1m	GCGACCGCCGGCTAAG
OluLCY pBAD e2m	GCGGGTTTCGATTCTAAAAGA
OluLCY_Seq_4p	GCTTTGGAATGGAGACTCTT
OluLCY_Seq_5m	ACGAGACCAACAGAAAGACC
OluLCY_Seq1	CCCGACAATCACCAAATC
OluLCYB1m	CTACATCGTCTCCGGCTTCATGTC
OluLCYB2m	CTACCCGTTTTCGACCGACTTG
OluLCYE1m	CTACGCTGAAGCGGAACTTGAG
OluLCYE1m_a	CTAGACCGCACCTTCGTTGG
OluLCYE1m_b	CTATTTGCGTTCGTTCCGTTAGAG
OluLCYE1p	CAGGACATGAAGCCGGAGAC
OluLCYE2m	CTACGCTTGCTCTTTGCGGTTGAC
OluLCYE2m_a	CTACATGCCTCCTTGCTGGGAC
OluLCYE2m_b	CTACTCCTCACCGTTTTCCACGTC
OluLCYpGEM_a1p	ATGCTCGCGCGCGCCG
OluLCYpGEM_e1m	AAAGAAATCGAGGGGTCCGCGAC
OluLCYpGEM_Sa1p	TGAATAATTACGGGGTGTGG
OluLCYpGEM_Sa2p	CGTGTTGCCGACGTTTT
OluLCYpGEM_Sa3p	TCACAAGCAGCACATTAGAC
OluLCYpGEM_Sa4p	CACGTTGAATTCGCGTCTC

OluLCYpGEM_Sa5p	GCAGATGCGCAACTTCTTTA
OluLCYpGEM_Sa6p	ACCTCACCGGTTCTCTTCCT
OluLCY-Prim1m	CTCCATACCGAACTGGTAGA
OluLCY-Prim2p	AACAGAGGCCAGCAATTCAC
OtLYE_pBAD_a3p	ATGACGCGGTTCGACGATG
OtLYE_pBAD_a4p	ATAGGCGACGCGGGAAC
OtLYE_pBAD_e3m	CGGGGTTTCGATTCTAAAAGA
pACCAR LCYB a1p	TTGCAATGCTGCTAATACCG
pACCAR LCYB e1m	CTTAAGTGTGAGCGGCTATG
pACCAR_1433p	TCAGTGCAATTTATCTCTTCAAATG
pACCAR crtE_a1p	CCGGTAAGGATAGCAATCAG
pACCAR16_1584_m	TCATACACGGTGCCTGACTG
pACCAR16_1768_m	GATGCGGGCTCATCCTC
pACCAR16_2804_p	GCTCCACAGAAAAGGCTGAG
pACCAR16_4060_p	TTGTAGACGAATTGCCAGTG
pACCAR16_4167_m	CATTGCAAGCCATTATGACG
pACCAR16_4774_p	TGGGAGACGATAAACCATGC
pACCAR16_5249_p	CCCCACGAGAATCAGATCAT
pACCAR16_6403_p	ACGGAATGAAATCCAATGGT
pACCAR16_6504_m	GAATCTCGCTCAGGAACTGG
pACCAR16_7479_p	TCGGGCTGTCCTTATAAACG
pACCAR16_7579_m	AAGCCTGCCAACCATGTTAT
pACCAR16_7785_m	AACGGGTGCGCATAGAAAT
pACCAR16_8123_m	CATTAGGAAGCAGCCCAGTA
pACCAR16_8774_p	GGGCCACCTCGACCTGA
pACCAR16_8830_m	GGAGTGGTGAATCCGTTAGC
pACCAR16_9798_p	GGGCACCAATAACTGCCTTA
pACCAR25_1632_p	GCTGTAGGCATAGGCTTGGT
pACCAR25_2287_m	TCTGGTCAGGCCCTTACTTC
pACC-LCY a1p	TCTGTCTTAATTAATAGGCGACGCGGGAAC
pACC-LCY e1m	TGATCTTACGTATCACGCTTGCTCTTTGCGGTTGAC
pBAD Vektor a1p	CGCAACTCTCTACTGTTTCTC
pBAD Vektor e1m	GCTTCTGCGTTCTGATTTA
pBAD-dHis-P	TGAGTTTAAACGGTCTCCAG
pBAD-dPrae-P	CATGGGTATGTATATCTCCTTCT
pCW Seq a1p	ACAGGAAACAGGATCAGCTTAC
pCW Seq e1m	CGTGGGAGTCAGCCATATTT
pET44a-reverse	TACGGCGTTTCACTTCTGA
pTrcHis a1p	GGCACTCGACCGGAATTAT
RNAi2_a1p	AGCCAAACCAGGATGATGTT
RNAi2_a2p	GACTGATTTGGCGGGCTAT
RNAi2_a3p	CGTCGTTCCGAGACATGTTA
RNAi2_e1m	TAGCGCTGATCACCACCAC
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
Spacer_m	TAGCGCTGATCACCACCACCC
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

## A.5. Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten

### Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten zur Pigmentquantifizierung mittels HPLC

Wellenlänge 440 nm  
 Fluss 1,3 ml / min  
 Detektorspez. Konst. 3508  
 [Area / (µg\*α)]

Name	λ max (HPLC) [nm]	λ max (Lit.) [nm]	α max (Lit.) [1/(g*cm)]	Literatur- quelle	λ quant [nm]	α-Faktor	α quant [1 / (g * cm)]	M [g / mol]	Area / m [µV * s / µg]	Area / n [µV * sec / µmol]
Astaxanthin	481	478	2100	2	440	0,646	1356	596,86	4757993	2839855485
Adonixanthin	466	461	2100	*	440	0,753	1581	584,89	5544996	3243212766
Zeaxanthin	455	454	2500	2	440	0,793	1983	568,89	6956877	3957697556
Canthaxanthin	476	480	2092	2	440	0,659	1378	564,86	4833338	2730159360
Echinenon	465	461	2158	2	440	0,792	1710	550,88	5997364	3303828126
4-Ketorubixanthin	471	-	2500	*	440	0,677	1692	566,88	5935259	3364579411
Rubixanthin	463	462	2680	*	440	0,708	1896	552,89	6651588	3677596593
β-Carotin	456	454	2500	2	440	0,791	1979	536,89	6941084	3726598326
Adonirubin	478	480	2096	*	440	0,661	1385	580,86	4859648	2822775239
4-Keto-α-Carotin	456	-	-	-	440	-	-	550,88	-	3595241955
4-Keto-Lutein	476	-	2100	*	440	0,837	1758	582,88	6168065	3595241955
Zeinoxanthin	449	-	-	-	440	-	-	552,89	-	4437563184
Lutein	448	447,8	2550	1	440	0,872	2224	568,89	7800389	4437563184
α-Carotin	448	448	2700	1	440	0,860	2323	536,88	8147665	4374318274
4-Keto-Zeinoxanthin	476	-	-	-	440	-	-	566,88	-	3595241955
Lycopin	474	474	3446	1	440	0,565	1946	536,88	6826999	3665279109
Violaxanthin	442	443	2550	1	440	0,984	2509	600,88	8802274	5289110161
Neoxanthin	438	438	2270	1	440	0,992	2252	600,88	7899455	4746624352
ε,ε-Carotin (ε-Carotin)	443	440	2980	1	440	0,968	2885	536,88	10119317	5432858975
β,ψ-Carotin (γ-Carotin)	463	462	2760	1	440	0,708	1953	536,88	6850143	3677704805
Antheraxanthin	448	446	2350	1	440	0,857	2014	584,88	7064937	4132140119
Chlorophyll a	430	664,3	87,67	1	440	0,708	62	893,50	217743	194553212
Chlorophyllide a	430	664	127	1	440	0,708	90	614,97	315425	193977114
Chlorophyll b	458	646,8	51,36	1	440	1,274	65	907,49	229538	208303168
Chlorophyllide b	458	628,97	74,07	1	440	1,274	94	628,97	331033	208209858
ε,ψ-Carotin (δ-Carotin)	454	456	3290	2	440	0,618	2033	536,88	7132536	3829315799

1 Phytoplankton pigments in oceanography. Part IV, Jeffrey et al. Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments, 1997, UNESCO, Page 449-559

2 Britton (1995)

\* geschätzt, siehe Diskussion

## A.6. Vergleich der Pigmentanteile aus den Verseifungs- und Reduktionsexperimenten zur Analyse der Pigmentzusammensetzung in Dauerstadien der Grünalgen

### Verseifungsexperimente

Verhältnis von $\alpha$ - bzw $\beta$ -Carotin abgeleiteten Carotinoiden	$\alpha$ -Carotin abgeleitete Carotinoide	davon Keto-carotinoide	$\beta$ -Carotin abgeleitete Carotinoide	davon Keto-carotinoide	Gesamt	davon Keto-carotinoide
<i>C. reinhardtii</i>	53%	76%	47%	70%	100%	73%
<i>F. tuberosa</i>	45%	37%	55%	55%	100%	47%
<i>S. rubescens</i>	46%	74%	54%	96%	100%	86%
<i>M. zofingiensis</i>	28%	71%	72%	95%	100%	88%
<i>H. pluvialis</i>	11%	16%	89%	98%	100%	89%

### Reduktionsversuche

Verhältnis von $\alpha$ - bzw $\beta$ -Carotin abgeleiteten Carotinoiden	$\alpha$ -Carotin abgeleitete Carotinoide	davon Keto-carotinoide	$\beta$ -Carotin abgeleitete Carotinoide	davon Keto-carotinoide	Gesamt	davon Keto-carotinoide
<i>C. reinhardtii</i>	54%	77%	46%	74%	100%	76%
<i>F. tuberosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. rubescens</i>	45%	75%	55%	99%	100%	88%
<i>M. zofingiensis</i>	28%	80%	72%	98%	100%	93%
<i>H. pluvialis</i>	7%	0%	93%	99%	100%	92%



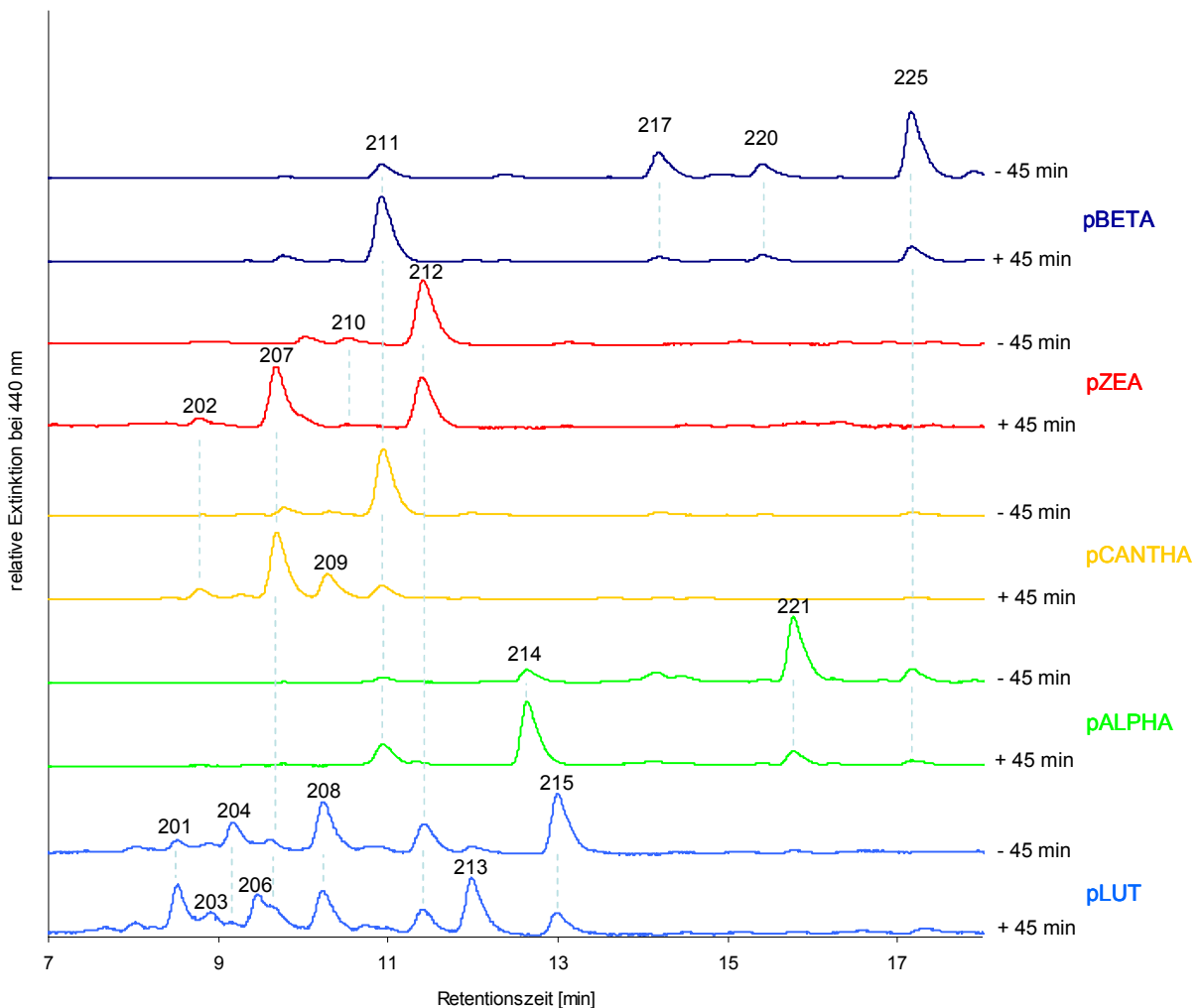
## A.7. Pigmentquantifizierung der Isomerisierungsprodukte von all-trans-4-Ketolutein

Versuch Thermische *trans-cis*-Isomerisierung von 4-Ketolutein  
 Wellenlänge 440 nm  
 Fluss 1,3 ml/min  
 Detektorspez. Konst. 3508  
 [Area / ( $\mu\text{g} \cdot \alpha$ )]

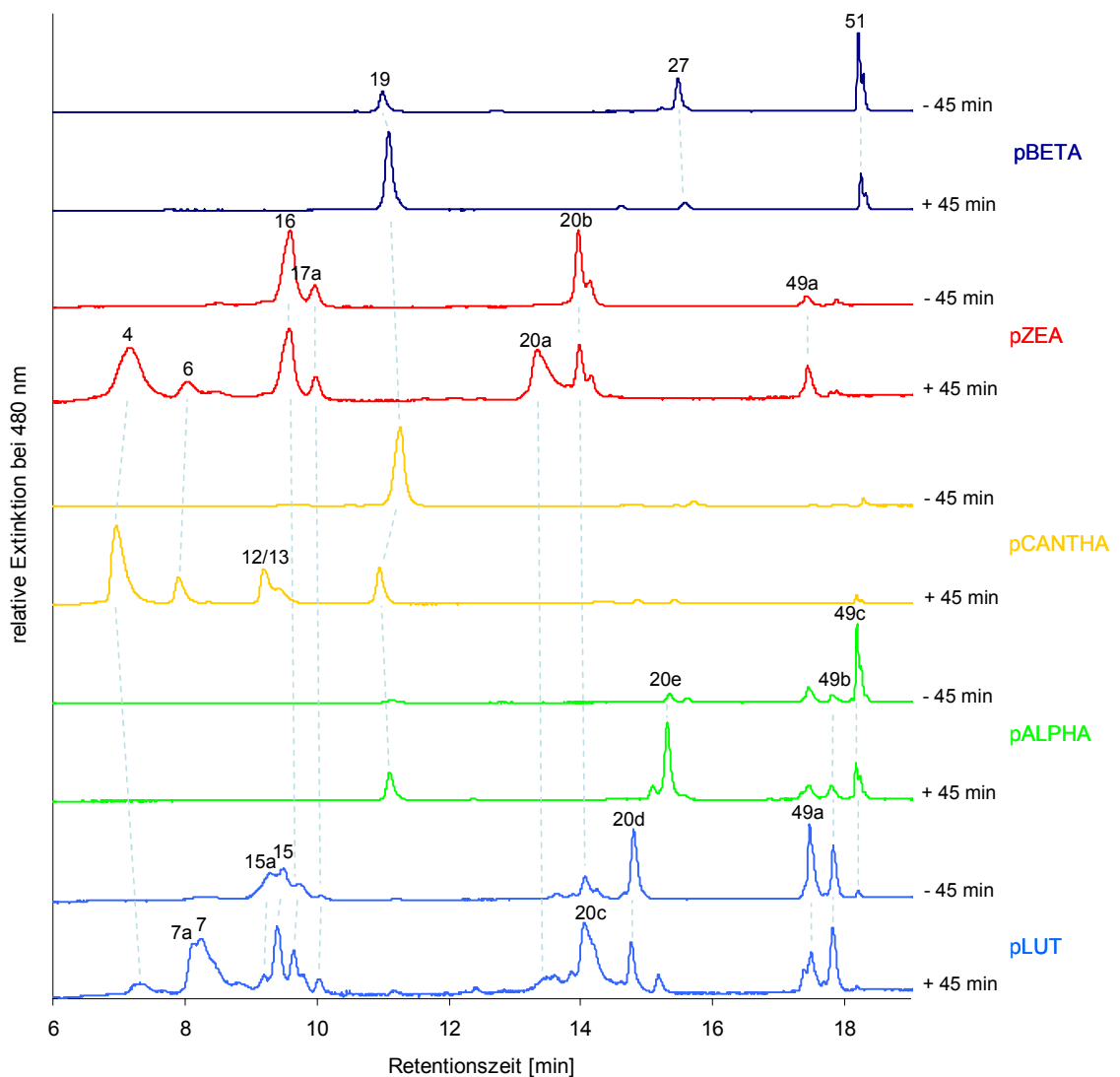
Retentionszeit [min]	Bezeichnung	Area [ $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ ]	$\alpha$ max <sup>1)</sup> [1/(g <sup>2</sup> cm)]	$\alpha$ -Faktor	$\alpha$ quant [1 / (g * cm)]	Area / m [ $\mu\text{V} \cdot \text{s} / \mu\text{g}$ ]	M [g / mol]	Area / n [ $\mu\text{V} \cdot \text{sec} / \mu\text{mol}$ ]	n [pmol]	Anteil [%]
9,7	<i>cis</i> -4-Ketolutein-Derivat	74796	2100	0,999	2098	7359799	582,88	4289879757	17	2
10,0	<i>cis</i> -4-Ketolutein-Derivat	87463	2100	0,992	2084	7311412	582,88	4261675616	21	2
10,4	<i>cis</i> -4-Ketolutein-Derivat	106054	2100	0,983	2065	7244761	582,88	4222826422	25	2
10,8	13- <i>cis</i> -4-Ketolutein	582293	2100	0,963	2022	7092139	582,88	4133865998	141	12
11,2	13'- <i>cis</i> -4-Ketolutein	522197	2100	0,940	1974	6923888	582,88	4035795645	129	11
12,2	all- <i>trans</i> -4-Ketolutein	2340336	2100	0,837	1758	6168065	582,88	3595241955	651	58
13,2	9- <i>cis</i> -4-Ketolutein	266452	2100	0,922	1935	6789718	582,88	3957591008	67	6
13,4	9'- <i>cis</i> -4-Ketolutein	288378	2100	0,880	1847	6479725	582,88	3776901858	76	7

<sup>1)</sup> geschätzt, siehe Diskussion

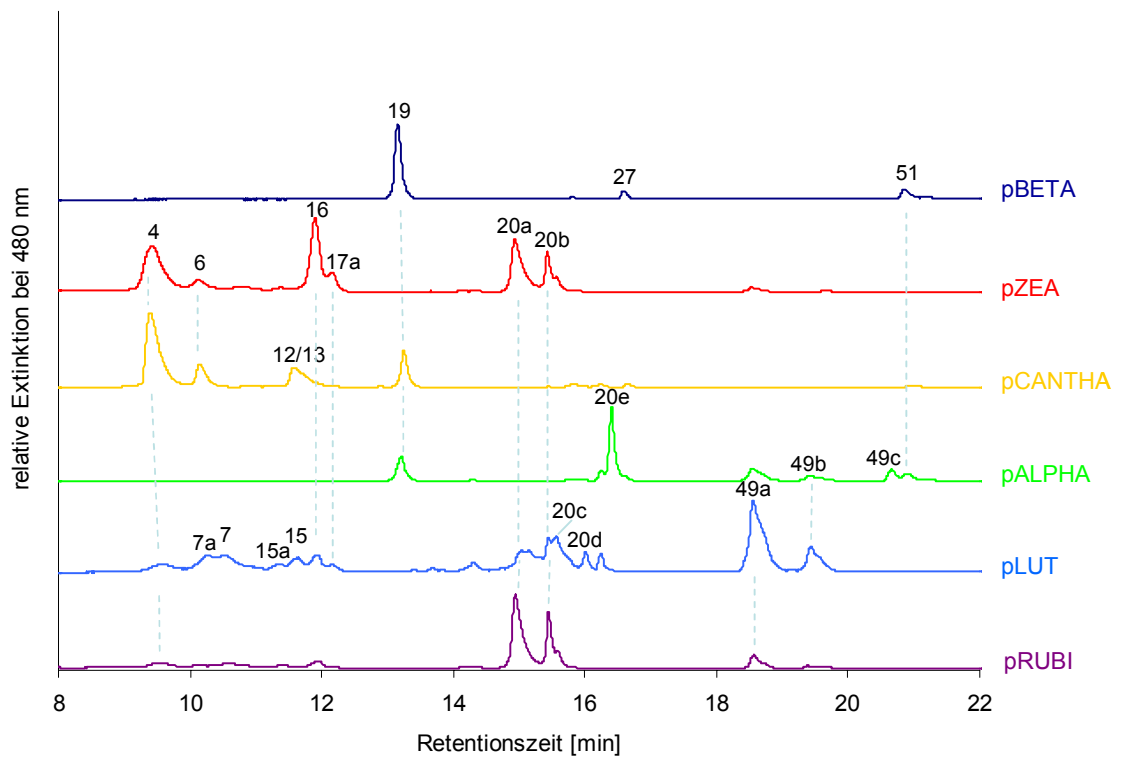
## A.8. Chromatogramme zu den Charakterisierungsexperimenten der BKT



**Abb. 82** Chromatogramme der heterologen Expression des Konstrukts *pBAD\_BKT\_5.1* in *Top10*-Zellen mit konstitutiv aktiven Plasmiden, die Enzyme zur Biosynthese verschiedener Carotinoid-Substrate beinhalteten. Im unteren Chromatogramm einer farblich abgesetzten Gruppe sind die Ergebnisse aus der HPLC-Analyse mittels der HPLC-Methode 3 auf einer C30-Säule von den Bakterientests nach 45 minütiger Induktion dargestellt. Im oberen Teil die uninduzierten Proben, die zum gleichen Zeitpunkt geerntet wurden. Eine Ausnahme stellt die Probe mit dem Konstrukt *pCANTHA* dar, bei der lag die BKT auf dem Plasmid, das konstitutiv aktiv war und in Hydroxylase *CHYB* lag auf dem *pBAD*-Vektor.



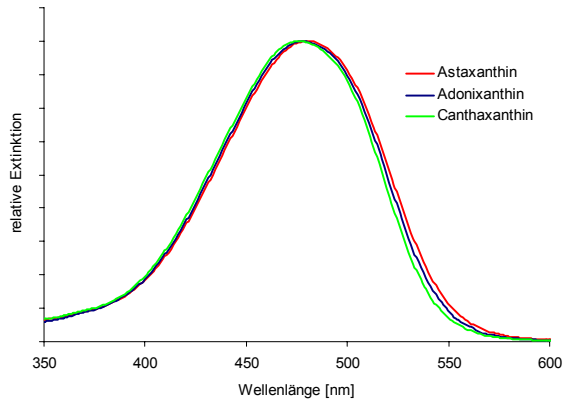
**Abb. 83** Chromatogramme der heterologen Expression des Konstrukts pBAD\_BKT\_5.1 in Top10-Zellen mit konstitutiv aktiven Plasmiden, die Enzyme zur Biosynthese verschiedener Carotinoid-Substrate beinhalteten. Im unteren Chromatogramm einer farblich abgesetzten Gruppe sind die Ergebnisse aus der HPLC-Analyse mittels der HPLC-Methode 1 auf einer C18-Säule von den Bakterientests nach 45 minütiger Induktion dargestellt. Im oberen Teil die uninduzierten Proben, die zum gleichen Zeitpunkt geerntet wurden. Eine Ausnahme stellt die Probe mit dem Konstrukt pCANTHA dar, bei der lag die BKT auf dem Plasmied, das konstitutiv aktiv war und in Hydroxylase CHYB lag auf dem pBAD-Vektor.



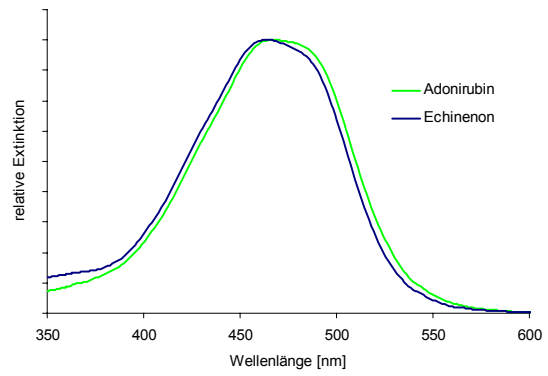
**Abb. 84** Chromatogramme der heterologen Expression des Konstrukts pBAD\_BKT\_5.1 in Top10-Zellen mit konstitutiv aktiven Plasmiden, die Enzyme zur Biosynthese verschiedener Carotinoid-Substrate beinhalteten. Im unteren Chromatogramm einer farblich abgesetzten Gruppe sind die Ergebnisse aus der HPLC-Analyse mittels der HPLC-Methode 2 auf einer C18-Säule von den Bakterientests nach 45 minütiger Induktion dargestellt. Im oberen Teil die uninduzierten Proben, die zum gleichen Zeitpunkt geerntet wurden. Eine Ausnahme stellt die Probe mit dem Konstrukt pCANTHA dar, bei der lag die BKT auf dem Plasmid, das konstitutiv aktiv war und in Hydroxylase CHYB lag auf dem pBAD-Vektor.

## A.9. Pigmentspektren

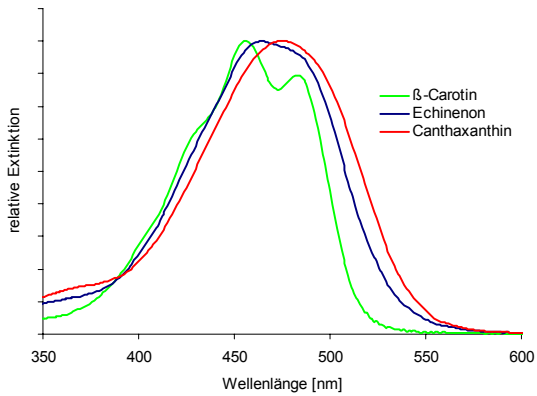
Die Spektren von Astaxanthin, Adonirubin und Canthaxanthin im Vergleich



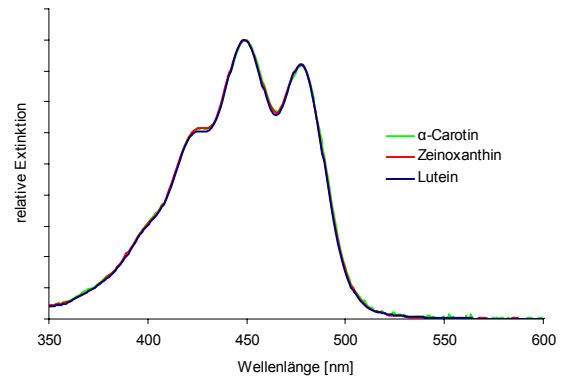
Die Spektren von Adonixanthin und Echinenon im Vergleich



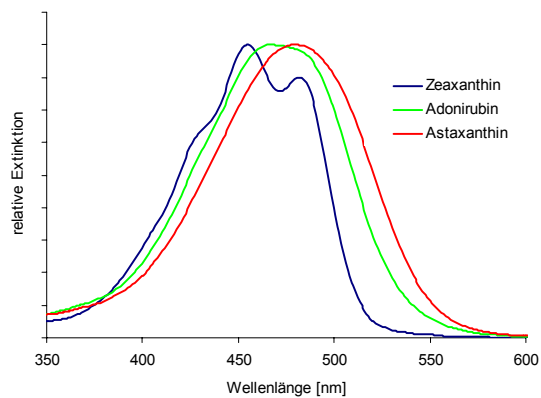
Die Spektren von  $\beta$ -Carotin, Echinenon und Canthaxanthin im Vergleich



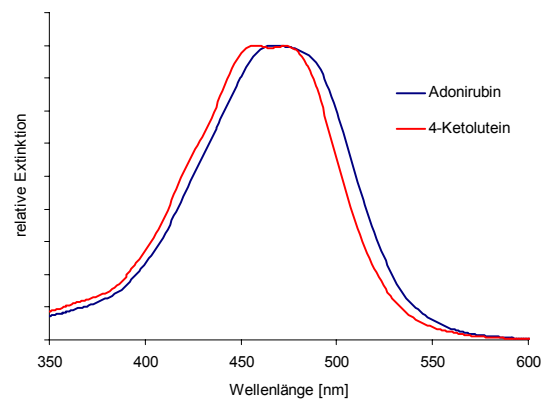
Die Spektren von  $\alpha$ -Carotin, Zeinoxanthin und Lutein im Vergleich



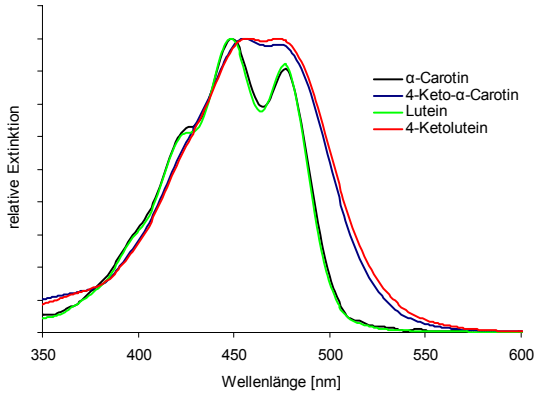
Die Spektren von Zeaxanthin, Adonixanthin und Astaxanthin im Vergleich



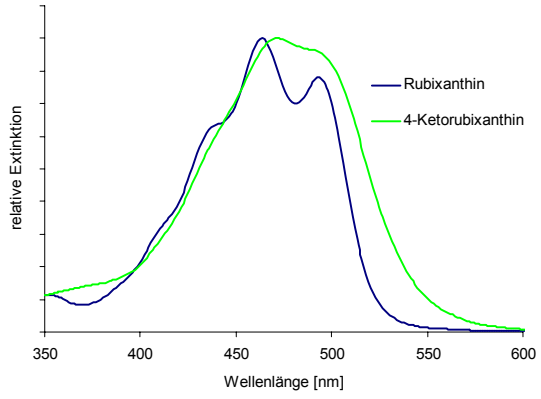
Die Spektren von Adonixanthin und 4-Ketolutein im Vergleich



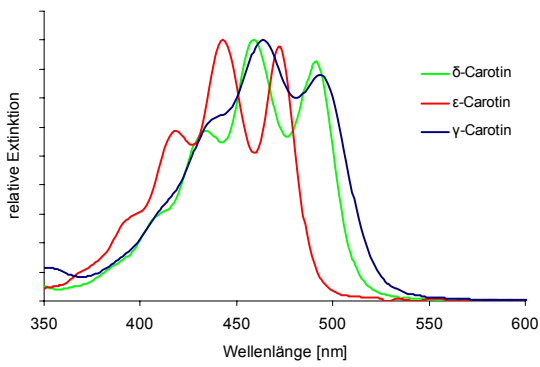
Die Spektren  $\alpha$ -Carotin- und 4-Keto- $\alpha$ -Carotinderivaten im Vergleich



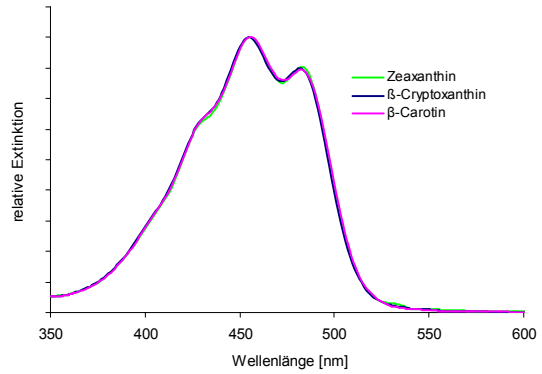
Die Spektren von Rubixanthin und 4-Ketorubixanthin im Vergleich



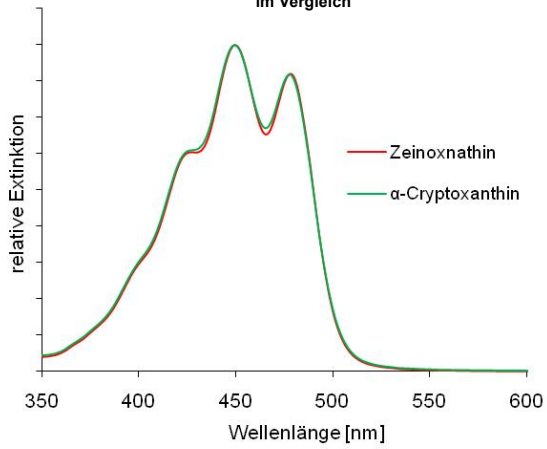
Die Spektren von Lycopin,  $\delta$ -Carotin,  $\epsilon$ -Carotin und  $\gamma$ -Carotin im Vergleich



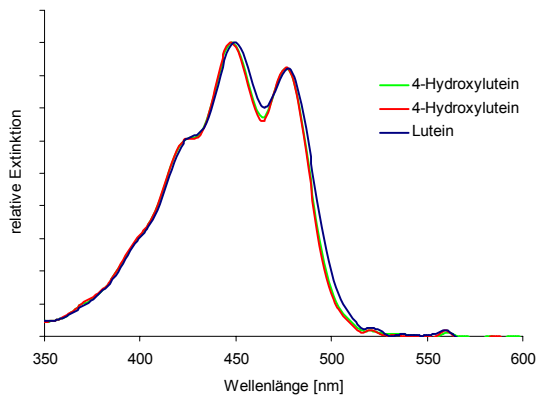
Die Spektren von  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin im Vergleich



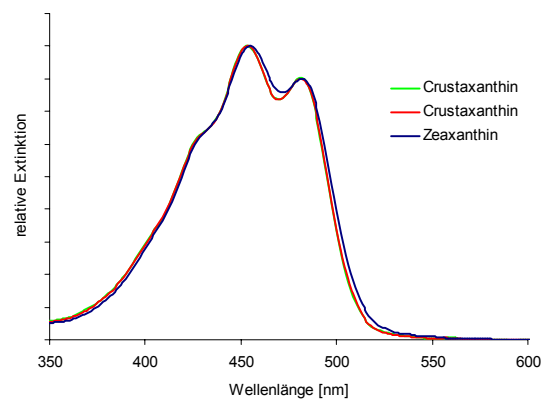
Die Spektren von Zeinoxanthin und  $\alpha$ -Cryptoxanthin im Vergleich



Die Spektren von reduziertem 4-Ketolutein und Lutein im Vergleich



Die Spektren von reduziertem Astaxanthin und Zeaxanthin im Vergleich



Die Spektren der reduzierten Pigmente Astaxanthin, Canthaxanthin und Adonirubin

